

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Vorstand: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum

**Evaluation und Optimierung eines neuen, semi-quantitativen Testes
zur schnellen Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF
Massenspektrometrie an klinischen Proben**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christina Hamacher

aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sören Schubert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Vogeser

PD Dr. rer. nat. Anton Eberharder

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Jette Jung

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2019

...all jenen, die mir wichtig sind

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Klinische Relevanz der <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.2. Verwendete Antibiotika und Resistenzmechanismen	2
1.2.1. Betalaktamantibiotika	2
1.2.1.1. Produktion von Betalaktamasen	3
1.2.1.2. Impermeabilität	3
1.2.1.3. Efflux-Systeme	4
1.2.1.4. Veränderung der Zielstruktur	4
1.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.2.3. Fluorchinolone	5
1.3. Konventionelle Resistenztestung	5
1.3.1. Agardiffusionstest	5
1.3.2. MHK-Teststreifen	6
1.3.3. Flüssigkeitsbasierte Verfahren	6
1.3.4. Automatisierte Verfahren	7
1.4. MALDI-TOF Massenspektrometrie	7
1.4.1. Geschichte	7
1.4.2. Funktionsprinzip	8
1.4.3. Erregeridentifikation als bisheriger Hauptanwendungsbereich	10
1.4.4. Ausweitung des Einsatzes auf schnelle Resistenztestung	11
1.4.4.1. Direkter massenspektrometrischer Nachweis resistenzvermittelnder Proteine	11
1.4.4.2. Zuordnung zu klonalen Linien resistenter Stämme	12
1.4.4.3. Der β -Laktamase Assay: Nachweis eines Resistenzmechanismus	12
1.4.4.4. Funktionelle Ansätze	13
1.4.4.4.1. Der SILAC-Assay: Detektion metabolischer Aktivität	13
1.4.4.4.2. Empfindlichkeitsprüfung bei Pilzen	14
1.4.4.4.3. MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA)	14
1.5. Ziele der vorliegenden Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16

2.1.1. Bakterienstämme	16
2.1.1.1. Ethikvotum	16
2.1.2. Nährmedien und Platten zur bakteriellen Kultivierung	16
2.1.2.1. Agarplatten	16
2.1.2.2. Flüssigmedien.....	17
2.1.3. Antibiotika	17
2.1.4. MHK-Teststreifen	18
2.1.5. Hilfsmittel bei der Erreger-Aufreinigung	18
2.1.6. Chemikalien	19
2.1.7. Technische Ausstattung.....	20
2.1.8. Bioinformatik	21
2.2. Methoden	23
2.2.1. Erreger-Identifikation direkt aus der Blutkulturflüssigkeit.....	23
2.2.2. MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA)	24
2.2.2.1. Extraktion der Erreger aus Blutkultur-Flaschen	24
2.2.2.2. Vorbereitung der Ansätze und Inkubation.....	24
2.2.2.3. Aufbereitung zur massenspektrometrischen Analyse	25
2.2.3. Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF	25
2.2.4. Konventionelle Resistenztestung	25
2.2.4.1. Automatisierte Testsysteme und alternative Testmethoden zum Nachweis von Resistenzgenen.....	26
2.2.5. Bestimmung der tatsächlichen Anzahl an KBE der eingesetzten Optischen Dichte.....	26
2.2.6. Protein-Bradford.....	27
2.2.7. Datenauswertung.....	28
2.2.7.1. FlexAnalysis.....	28
2.2.7.2. Software-Prototyp	28
2.2.7.3. Graphische Darstellungsmöglichkeiten.....	29
3. Ergebnisse	31
3.1. Austitration der optimalen Einsaat-Dichte	31
3.2. Analyse positiver Blutkulturen	35
3.2.1. Cefotaxim.....	36
3.2.2. Ciprofloxacin	37
3.2.3. Piperacillin/Tazobactam	39

3.3. Variabilität des internen Standards	40
3.4. Biologische und technische Replikate	42
3.5. Vergleich aerobe und anaerobe Kulturbedingungen	44
3.6. Verkürzung der nötigen Inkubationszeit	44
4. Diskussion	48
4.1. Stellenwert der in vitro Testung	48
4.2. Optimierung der Testprotokolle für den Einsatz bei Blutkulturen	49
4.3. Mögliche Erklärungen für die Missklassifikationen	51
4.3.1. Testaufbau	52
4.3.2. Ciprofloxacin	55
4.3.3. Piperacillin/Tazobactam	58
4.3.4. Pseudomonas aeruginosa	59
4.4. Beurteilung der Praxistauglichkeit	61
4.4.1. Handhabung und Integrierbarkeit in den Routineablauf	63
4.4.2. Mögliche Fehlerquellen	63
4.4.3. Zeitaufwand	64
4.5. MBT-ASTRA im Kontext der gegenwärtigen Resistenztestung	64
4.5.1. Automatisierte Testsysteme	65
4.5.1.1. Performance	65
4.5.1.2. Time to result	66
4.5.2. Vergleich mit anderen massenspektrometrischen Ansätzen	66
4.5.3. Andere in Entwicklung befindliche Techniken	68
4.6. Ausblick	69
5. Zusammenfassung	71
Literaturverzeichnis	72
Anhänge	80
Abkürzungsverzeichnis	81
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	84
Danksagung	85
Veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit	86
Eidesstattliche Versicherung	87

1. Einleitung

1.1. Klinische Relevanz der *Enterobacteriaceae*

Die Gram-negativen, nicht sporenbildenden und fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* besitzen als Gemeinsamkeit das *Enterobacteriaceae*-common-Antigen (ECA). Humanmedizinisch wichtige Gattungen sind *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* und *Yersinia*. Unter ihnen sind Erreger klassischer Infektionskrankheiten, wie der Salmonellenenteritis, Typhus oder der Pest. Bei *Escherichia coli* handelt es sich außerdem um den wichtigsten Fäkalkeim. Besondere Bedeutung kommt dieser Familie auch dadurch zu, dass sie mit ca. 50 % die vorherrschende Ursache nosokomialer Infektionen darstellt ¹. Ein ebenfalls relevantes Gram-negatives Stäbchenbakterium - aus der Untergruppe der Nonfermenter – ist *Pseudomonas aeruginosa*. Nosokomiale Infektionen entstehen in zeitlichem Zusammenhang zu einem Krankenhausaufenthalt und machen eine der häufigsten Komplikationen dieser Aufenthalte aus. Das Robert-Koch-Institut (RKI) definiert: „Eine Infektion wird als nosokomial bezeichnet, wenn der Infektionstag (= Tag mit dem ersten Symptom) frühestens der Tag drei des Krankenhausaufenthaltes ist“ ². Oftmals finden sich dabei Isolate der Spezies *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. und *Klebsiella* spp. ³. Auch in der europaweiten Prävalenzerhebung verhielt es sich ähnlich ⁴. Die gängigsten nosokomialen Infektionen sind: Pneumonie, Sepsis, Wund- und Harnwegsinfektion ⁴. Sie können zu einer Verlängerung der Verweildauer und zusätzlichen Behandlungskosten führen, aber auch die - möglicher Weise vermeidbare – direkte Todesursache sein ^{5,6}. Man unterscheidet primär von sekundär endogenen Infektionen und exogen bedingte Infektionen. Leider gehören die Erreger nosokomialer Infektionen oftmals zu den multiresistenten Stämmen ⁷. Diese Tatsache erschwert die Therapie und bedingt eine erhöhte Mortalität.

Betrachtet man nosokomiale Infektionen bei Intensivpatienten in Deutschland, ist die Häufigkeit des Auftretens von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämmen hoch aber konstant, wohingegen das Vorkommen von multiresistenten Gram-negativen (MRGN) Isolaten stark ansteigt ^{3,8}. Besonders gefährlich für das Leben des Patienten wird es, wenn die Erreger in die Blutbahn eindringen, und somit eine Bakteriämie bis hin zu einer systemischen Infektion vorliegt ⁹. Ein internationales

Gremium definiert in seiner neuen Veröffentlichung die Sepsis als „lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine fehlregulierte Antwort auf eine Infektion verursacht wird“¹⁰. Sie wird als die primäre Todesursache bei Infektionen verstanden, besonders wenn sie nicht erkannt und zeitnah behandelt wird.

Gram-negative Bakterien haben eine zweite, äußere Membran. Sie sind also Endotoxinbildner, denn beim Endotoxin handelt es sich um ein Lipopolysaccharid eben dieser äußeren Membran. Zerfällt die Bakterienzelle, z.B. nach Lyse durch einen Leukozyten, wird dieses freigesetzt. Es gehört zu den stärksten Stimulatoren der Zytokinkaskaden, die zu Fieber führen. Bei sehr virulenten Stämmen kann es bis zum Endotoxinschock kommen, weshalb Sepsitiden, die durch Gram-negative Bakterien verursacht werden, besonders gefürchtet sind. Auch stellt *Escherichia coli* mit 15-20 % den häufigsten Sepsiserreger dar¹.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass das Krankheitsbild der Sepsis, v.a. verursacht durch Gram-negative Stäbchenbakterien, diagnostische Eile gebietet. Dass Gram-negative Erreger häufig bei nosokomialen Infektionen vorgefunden werden, und dann wiederum mit höherer Wahrscheinlichkeit Resistenzen aufweisen, verschärft die Dringlichkeit. Eine schnelle Aussage zur Resistenzlage ist folglich von essentieller Bedeutung, um mit der kürzest möglichen Verzögerung die passende und über die Prognose entscheidende Therapie einzuleiten.

1.2. Verwendete Antibiotika und Resistenzmechanismen

Da Gegenstand dieser Arbeit die Diagnostik von Blutkulturen septischer Patienten ist, wurden für die Studie drei repräsentative und im Klinikalltag gebräuchliche Antibiotika ausgewählt.

1.2.1. *Betalaktamantibiotika*

Aus der Reihe der bakteriziden und für den Patienten wenig toxischen β -Laktam-Antibiotika kam Cefotaxim (CTX) als Beispiel für ein Drittgenerations-Cephalosporin zum Einsatz. Außerdem das sehr breit wirksame Ureidopenicillin Piperacillin in Kombination mit dem Betalaktamase-Inhibitor Tazobactam (TZP). Betalaktamantibiotika wirken über die Inhibition der Penicillin-Bindeproteine (PBP). Dabei handelt es sich um Transpeptidasen. Der Wirkmechanismus ist folglich eine Störung der osmotischen Integrität der Zellen über die Hemmung der Zellwandsynthese. Die PBP befin-

den sich in der Zellwand im periplasmatischen Raum zwischen der äußeren und der inneren Zellmembran. Um an den Wirkort zu gelangen, müssen die β -Laktame demnach die äußere Zellmembran mittels Diffusion durch Porine überwinden. Aufgrund dieser Permeabilitäts-Besonderheit weisen *Enterobacteriaceae* auch eine intrinsische Resistenz gegen z.B. Penicillin G auf ¹¹.

Die häufigsten Resistenzmechanismen gegenüber β -Laktamen in der Familie der *Enterobacteriaceae* sind im Folgenden dargestellt.

1.2.1.1. Produktion von Betalaktamasen

Die mit Abstand häufigste und wichtigste Form der Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika bei *Enterobacteriaceae* ist die Produktion von inaktivierenden Enzymen. Die Amid-Bindung des β -Laktam Rings wird hydrolytisch gespalten. Für die große Vielfalt der Betalaktamasen gibt es zwei Klassifikationssysteme, eines basierend auf der Aminosäuresequenz und ein funktionelles. Vereinfacht gibt es Schmal- und Breitspektrum Penicillinasen/Betalaktamasen, jeweils mit oder ohne Empfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Substanzen, wie z.B. Clavulansäure. Besondere klinische Bedeutung haben die Carbapenemasen gewonnen. Dies sind Betalaktamasen, die auch Carbapeneme wie Meropenem und Imipenem hydrolysieren und für die es häufig keine zur in-vivo Anwendung geeigneten Inhibitoren gibt ¹¹.

Bei Stämmen, die extrazelluläre β -Laktamasen produzieren, kann abhängig vom Inokulum eine unterschiedliche minimale Hemmkonzentration resultieren ¹². Der Inokulum-Effekt ist dabei von der Menge und der Aktivität des produzierten Enzyms abhängig.

1.2.1.2. Impermeabilität

Wie bereits beschrieben, können und müssen β -Laktam-Antibiotika durch Porine die äußere Zellmembran überwinden, sofern sie hydrophil und ausreichend klein sind. Ein möglicher Resistenzmechanismus ist eine herabgesetzte Permeabilität durch qualitative oder quantitative Änderungen der Kanäle in der Zellmembran. Dieser Mechanismus wurde z.B. bei *E. coli*, *Enterobacter* spp. und *Klebsiella* spp. beschrieben und führt eher zu einer Resistenz von geringerer Ausprägung, kann aber mit anderen Mechanismen assoziiert sein ¹¹.

1.2.1.3. *Efflux-Systeme*

Efflux-Systeme bestehen meist aus drei Komponenten: zum einen aus einer tatsächlichen Pumpe, lokalisiert in der Zytoplasmamembran, zur aktiven Elimination von Toxinen, aber auch metabolischen Abfallprodukten. Eine zweite Einheit sitzt in der äußeren Membran und stellt die Ausschleusung in die Umgebung sicher. Und schließlich überbrückt ein Protein im periplasmatischen Raum die Lücke zwischen diesen beiden Untereinheiten. Die Kombination der bisher genannten Arten von Resistenz kann zur Multiresistenz gegenüber den verschiedensten Antibiotikaklassen führen ¹¹.

1.2.1.4. *Veränderung der Zielstruktur*

Hierbei sind verschiedene Ursachen denkbar, z.B. Punktmutationen im Gen des Penicillin-Bindeproteins mit veränderter Affinität oder Überproduktion des „normalen“ Proteins. Dieser ist zwar kein sehr häufiger Resistenzmechanismus der *Enterobacteriaceae* gegen Betalaktame ¹¹, ist aber z.B. bei MRSA mit der Veränderung des PBP 2a anzutreffen.

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Das Gram-negative Stäbchenbakterium *P. aeruginosa* ist ein humanmedizinisch sehr relevanter Erreger bei Patienten mit eingeschränkter Immunkompetenz und auch bei nosokomialen Infektionen. Er stammt aus der heterogenen Gruppe der Nonfermenter. Durch die natürliche Bildung von Cephalosporinasen, das Vorhandensein von Efflux-Systemen und der Impermeabilität für viele hydrophobe β -Laktame, ist diese Spezies intrinsisch resistent gegen Erst- und Zweitgenerations-Cephalosporine. Gegen Piperacillin/Tazobactam und Ciprofloxacin sind Wildtyp-Isolate von *P. aeruginosa* in der Regel empfindlich. Nicht nur das hohe Maß an intrinsischer Resistenz macht sie schwer zu behandeln. Häufig kommen erworbene Resistenzen hinzu.

Hierzu zählen zusätzliche Betalaktamasen und eine Überproduktion der chromosomalen Cephalosporinasen. Unter die nicht-enzymatischen Mechanismen fällt der Verlust von Porinen und daraus resultierende Impermeabilität für einzelne Antibiotika. Außerdem kann eine Überexpression der Efflux-Systeme vorliegen und, am wenigsten häufig, die Modifikation des PBP ¹¹.

1.2.3. Fluorchinolone

Bei Vertretern dieser Substanzklasse handelt es sich hinsichtlich des Wirkmechanismus um Gyrasehemmer. Die Gyrase ist die bakterielle Typ II Topoisomerase und kann die Raumorientierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) verändern. Somit ist sie in der Replikationsphase sich teilender Bakterienzellen von essentieller Bedeutung. Dieses Enzym wird durch Fluorchinolone inhibiert. Da Fluorchinolone aber bakterizide Substanzen sind, gibt es vermutlich noch weitere Effekte. Ciprofloxacin (CIP) wurde repräsentativ für diese Antibiotikareihe ausgewählt.

Die Mechanismen, die hauptsächlich zur Resistenz von Gram-negativen Bakterien gegenüber Fluorchinolonen beitragen, sind die Veränderung der Zielstruktur, eine herabgesetzte Permeabilität und eine Plasmid-vermittelte Resistenz durch ein Protein, das verhindert, dass das Chinolon an die DNS-Gyrase binden kann. Andere Resistenzplasmide kodieren eine Efflux-Pumpe oder eine Acetyltransferase, die die antibiotische Substanz inaktiviert. Letztere ist die häufigste Art der Chinolon-Resistenz¹¹.

1.3. Konventionelle Resistenztestung

Das Antibiogramm eines Krankheitserregers ist essentiell für die erfolgreiche Behandlung einer Infektion. Die tatsächliche Interpretation der in vitro generierten Ergebnisse ist komplex, z.B. muss berücksichtigt werden, ob unter Therapiebedingungen die wirksame Konzentration erreicht werden kann, ohne den Patienten durch die mögliche Toxizität der Substanz zu gefährden. Im Nachfolgenden sind die gängigsten Methoden der Routinediagnostik zur Empfindlichkeitsprüfung an Reinkulturen aufgeführt⁷.

1.3.1. Agardiffusionstest

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, die die Erreger an einer weiteren Vermehrung hindert, auch wenn es sich um ein bakterizides, also abtötendes Antibiotikum handelt. Wird ein genauer Wert verlangt, wird in der Regel dieser anstatt der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) bestimmt.

Der Agardiffusionstest ist ein in der Praxis bewährtes Verfahren, das die gleichzeitige Testung mehrerer Substanzen erlaubt. Der interessierende Stamm wird flächig auf eine Mueller-Hinton-Agarplatte ausgestrichen. Danach werden Filterpapierplättchen, die mit den verschiedenen Antibiotika getränkt sind, auf die Platte gelegt und diese dann über Nacht bebrütet. Während der Inkubationszeit können die Substanzen in den Agar diffundieren und ein Konzentrationsgefälle ausbilden. Schaffen sie es, die entstehenden Kolonien am Wachstum zu hindern, entsteht um die Plättchen ein sogenannter Hemmhof. Die MHK für die jeweiligen Antibiotika korreliert zwar mit dem resultierenden Hemmhofdurchmesser, jedoch erlaubt diese Methode nur eine Klassifikation in die Kategorien empfindlich, intermediär und resistent. Dafür wird der Hemmhof vermessen und mit Referenzwerten abgeglichen ⁷.

1.3.2. MHK-Teststreifen

Beim MHK-Teststreifen wird analog den Vorgaben für den Agardiffusionstest vorgegangen ¹³. Der Unterschied ist, dass die Substanz in einem Gradienten aufgebracht ist, welcher durch die Beschriftung des Teststreifens abgebildet wird. So erhält man die genaue MHK statt nur der Zuweisung empfindlich, intermediär oder resistent. Auch in diesem Fall entsteht nach Ablauf der Inkubationszeit eine wachstumsfreie Zone, allerdings ist sie elliptisch. An der Stelle, an der die Kolonien bis an den Teststreifen heranwachsen, kann der Wert für die MHK an der Skala abgelesen werden. Die Ergebnisse sind so verlässlich, wie die der vergleichbaren Methoden der Agardiffusion, der Boullionverdünnung (im Folgenden beschrieben), sowie der Agardilution (entsprechend der Boullionverdünnungs-Methode, jedoch mit solidem Medium) ¹⁴.

1.3.3. Flüssigkeitsbasierte Verfahren

Für die Boullionverdünnungs-Methode wird eine geometrische Verdünnungsreihe des zu testenden Antibiotikums hergestellt und anschließend jedes Röhrchen mit der gleichen Erregermenge beimpft. Zusätzlich wird das Isolat zur Wachstumskontrolle in einem separaten Ansatz nur in flüssiges Kulturmedium eingebracht. Nach Ablauf der Übernachtinkubation wird das Wachstum, oder dessen Ausbleiben, über den Trübungsstand der Flüssigkeit registriert und beurteilt. Die niedrigste Antibiotikakonzentration, die zu einem klaren Röhrchen führt, entspricht der MHK ¹⁵.

Möchte man eine Aussage zu mehreren Substanzen treffen, ist für jede ein separater Ansatz nötig. Deshalb wurde die Mikrodilution entwickelt, d.h. die Verminderung der Testvolumina und Zusammenführung in Testkassetten z.B. in Form von Mikrotiterplatten^{7,16}.

1.3.4. Automatisierte Verfahren

Die Miniaturisierung ermöglichte schließlich auch die Automatisierung. Dabei können alle Schritte maschinell ablaufen, von der Inokulation über die Inkubation bis zur Auswertung. Die Trübung wird dabei nicht mit dem Auge, sondern photometrisch gemessen. Es kann an einem bestimmten Endpunkt nach Ablauf einer festgelegten Zeit erfolgen, oder in einem dynamischen System, im ständigen Abgleich mit der Kontrolle.

Ähnlich dem Agardiffusionstest stellt der Breakpoint-Test einen MHK-Mikrodilutionstest in verkürzter Form dar. Es werden nur jeweils zwei bis drei Verdünnungsstufen unter- bzw. oberhalb des MHK-Grenzwertes des jeweiligen Antibiotikums gemessen, der z.B. durch das *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) festgelegt wurde⁷.

Auch der molekularbiologische Nachweis von Resistenzgenen ist ein möglicher Ansatz zur Empfindlichkeitsprüfung. Hier existieren ebenfalls automatisierte Testsysteme. Allerdings wird bei diesen molekularen Testen jeweils nur die Anwesenheit oder das Fehlen eines Resistenzgenes nachgewiesen. Ob dieses tatsächlich exprimiert und ein Resistenzphänotyp ausgebildet wird, bleibt durch diese Tests unbeantwortet.

1.4. MALDI-TOF Massenspektrometrie

1.4.1. Geschichte

Wie der Name schon impliziert, können mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) die Massen einzelner Probenmoleküle bestimmt werden, genauer gesagt das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) deren ionisierter Form. Es gibt unterschiedliche Prinzipien zur Ionisation und Detektion und diese Technik wird in der analytischen Chemie schon lange verwandt. 1975 wurde erstmals deren mögliche Ausweitung auf die Identifikation von Mikroorganismen vorgeschlagen¹⁷. Allerdings brachte erst die

Entwicklung sanfter Ionisationsmethoden, wofür John B. Fenn und Koichi Tanaka 2002 den Nobelpreis für Chemie verliehen bekamen, den Durchbruch. Dadurch konnten in den späten 1980er Jahren erstmals intakte Makromoleküle, also auch Proteine, erfasst werden ¹⁸. Nachdem Holland et al. 1996 zum ersten Mal eine Methode publizierten, nach der mittels MALDI-TOF MS (siehe unten) ohne vorherige Aufschlüsselung der Zellen charakteristische Spektren zur Identifikation von Bakterien generiert werden konnten ¹⁹, wurde dieser Ansatz von vielen Forschergruppen aufgegriffen und für die verschiedensten Mikroorganismen perfektioniert ²⁰.

1.4.2. Funktionsprinzip

Grundsätzlich besteht jedes Massenspektrometer aus folgenden Komponenten: einer Ionenquelle zur Erzeugung der Ionen, einem Massenanalysator zu deren Auftrennung und einem Detektor, der den eintreffenden Ionenstrom misst. Im resultierenden Spektrum sind die relativen Häufigkeiten der einzelnen Ionen (in Form der Peak-Intensität) gegenüber deren m/z -Verhältnis dargestellt. In vorliegender Arbeit soll es um die Form der *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight* Massenspektrometrie [Deutsch: Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung in Verbindung mit der Flugzeitanalyse] gehen ²¹.

Komponenten jedes Massenspektrometers

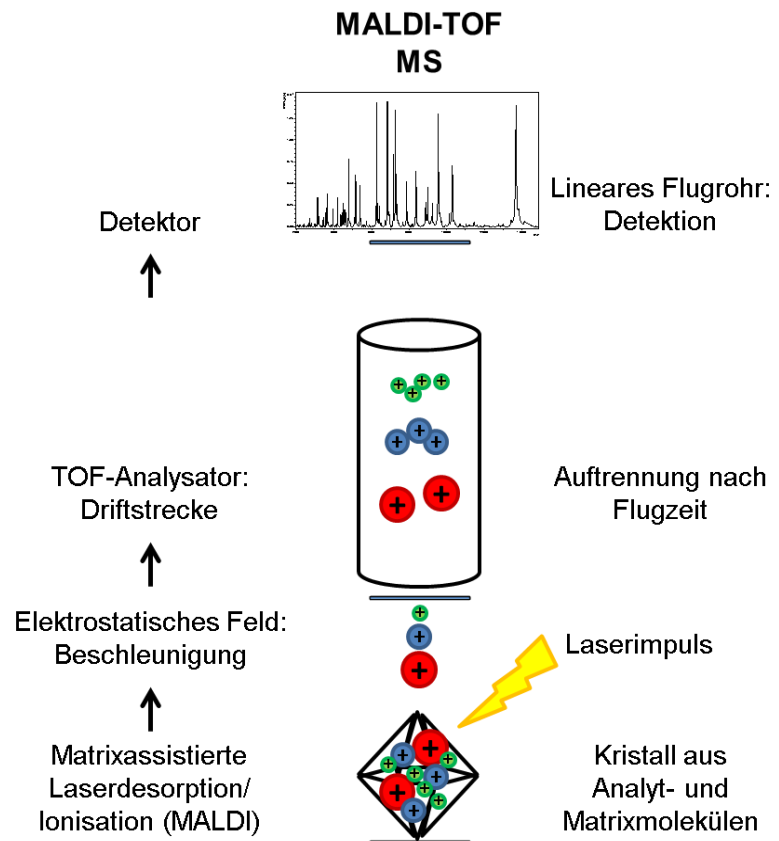


Abb. 1. Funktionsprinzip eines MALDI-TOF Massenspektrometers. Die Probe ko-kristallisiert mit den Matrixmolekülen auf einem Stahlträger. Die Trägerplatte wird mit kurzen Laserimpulsen beschossen, was zur Bildung meist einfach positiver Ionen und deren Übertritt in die Gasphase führt. Die Ionen werden über ein durch Elektroden erzeugtes elektrostatisches Feld beschleunigt und über die Fokussierungslinse in das Vakuum der Driftstrecke entlassen. Während der Flugphase kommt es zu einer Auftrennung der Ionen nach der Größe, da dieselbe Beschleunigungsenergie bei kleineren Molekülen in einer höheren Geschwindigkeit resultiert. Folglich treffen die Bioanalyte aufgetrennt nach ihrem Masse/Ladungs-(m/z -)Verhältnis am Detektor auf und werden in Form eines Massenspektrums mit Peaks unterschiedlicher Intensitäten dargestellt.

Mit der Entwicklung der matrixassistenten Laserdesorption als Ionisierungsprinzip gelang erstmals die Analyse intakter Proteine in ausreichender Intensität, welche bis dahin wegen ihrer Größe durch den Laser fragmentiert worden waren. Bei der Matrix handelt es sich um organische Moleküle, die die Eigenschaft besitzen, besonders gut Licht der eingestrahnten Wellenlänge zu absorbieren. Sie wird mit einem volatilen Lösungsmittel dem Analyt mit einem vielfachen molaren Überschuss hinzugefügt und baut die Probenmoleküle in das eigene Kristallgitter ein. In dieser Arbeit wurde α -Cyano-4-hydroxysäure (4-HCCA) als Matrix verwendet, welche Licht der Wellenlänge 337 und 355 nm absorbiert. Der nur wenigen Nanosekunden lange impulsive Beschuss mit kurzweiliger Laserstrahlung (Photonen) bewirkt eine explosive Auflösung eines Teils der Kristalloberfläche und somit einen Phasenübergang von fest zu gasförmig. Allerdings darf die Bestrahlungsstärke nicht zu hoch sein, da sonst die

Probe zerstört würde. Für MALDI-TOF MS kommen meist Nd-YAG- oder Stickstofflaser unterschiedlicher Wellenlänge und Impulsdauer zur Anwendung.

Eine unweit der Probe befindliche Elektrode erzeugt die Beschleunigungsspannung. Es resultiert eine kinetische Energie von einigen Kiloelektronenvolt. Die Ionen durchqueren die anschließende feldfreie Driftstrecke im Hochvakuum mit einer unterschiedlichen Flugzeit, die beim Eintreffen am Detektor gemessen wird. Alle Ionen erfahren die gleiche kinetische Energie, diese bewirkt allerdings unterschiedliche Geschwindigkeiten, wodurch die Auftrennung nach dem jeweiligen Masse/Ladungs- (m/z -)Verhältnis gelingt. Durch Messung der Flugzeit bei bekannter Spannung und Flugstrecke lässt sich das m/z -Verhältnis berechnen. Dies entspricht ziemlich genau der Molekülmasse, da es sich bei MALDI meist um einfach positiv geladene Ionen handelt ²¹.

1.4.3. *Erregeridentifikation als bisheriger Hauptanwendungsbereich*

Diese sehr sensitive Methode hat bei der Differenzierung von Bakterien und Pilzen die biochemischen Methoden weitgehend abgelöst und ist aus der mikrobiologischen Routinediagnostik nicht mehr weg zu denken. Eine sehr geringe Biomasse ist für eine Identifikation schon ausreichend. Wenige Stunden Inkubation einer Kolonie nach dem Beimpfen einer Agarplatte genügen, weshalb auch Mischkulturen innerhalb eines Tages aufgetrennt und identifiziert werden können. Dafür wird Material aus einer Einzelkolonie auf die Trägerplatte aufgebracht und mit einem μL der gelösten Matrix überschichtet. Nach dem Trocknen wird das Target in das Massenspektrometer eingeschleust und das individuelle Spektrum des untersuchten Bakteriums oder Pilzes, wie oben beschrieben, generiert und aufgezeichnet. Die Identifikation auf Spezies-Level erfolgt dann durch den automatisierten Abgleich des Spektrums mit einer Referenzdatenbank. Es wird hierfür üblicherweise der Massenbereich von zwei kDa bis 20 kDa herangezogen, in welchem vor allem die ribosomalen Proteine abgebildet werden. Diese lassen sich gut ionisieren und liefern reproduzierbare Ergebnisse ²². Da durch verschiedene Einflussfaktoren die Spektren nie exakt identisch sein werden, errechnet die mitgelieferte Software einen Wert („score value“), der bei der Beurteilung der Validität helfen soll. Er spiegelt die Ähnlichkeit wider, die die aktuelle Messung beim automatischen Abgleich mit den in der Datenbank hinterlegten Spektren aufweist. Liegt dieser Wert über zwei, ist die Spezieszuordnung mit hoher Wahrscheinlichkeit richtig. Bei einem Wert zwischen 2,0 und 1,7 kann nur eine verlässli-

che Aussage auf Ebene der Gattung getroffen werden. In Tabellenform werden die zehn am besten passenden Vergleichstreffer für die Plausibilitätskontrolle dargestellt²².

Für die Identifikation der Erreger aus Urinproben bei signifikanter Bakteriurie ist theoretisch keine Vorinkubation zur Vervielfältigung der Krankheitserreger notwendig. Es sind bereits ausreichend bakterielle Zellen vorhanden, um eine Direktbestimmung zu ermöglichen. Die Voraussetzung ist allerdings, dass eine Monokultur vorliegt. Im Rahmen der Sepsis-Diagnostik ist es möglich, die Identifikation gleich ausgehend von der Blutkulturflüssigkeit vorzunehmen, sobald die Probe im Inkubator positiv gemeldet wurde, ohne den Weg über eine Vorinkubation auf einer Agarplatte²³. Dafür existieren verschiedene Protokolle²⁴⁻²⁶. Auch eine Messung mit Material direkt aus einer Anreicherungsbouillon, ohne vorherige Kultivierung auf Festmedium, ist möglich²⁷.

1.4.4. Ausweitung des Einsatzes auf schnelle Resistenztestung

Nachdem die MALDI-TOF Massenspektrometer zunehmend Einzug in die diagnostischen Labore erhalten, ist das Interesse groß, die Anwendungsmöglichkeiten dieser schnellen und akkuraten Technik auszudehnen. Besonders attraktiv wäre es, wenn die zur Antibiotika-Resistenztestung nötige Zeit ebenfalls verkürzt werden könnte. Dahingehend wurden in jüngerer Vergangenheit bereits diverse Ansätze verfolgt.

1.4.4.1. Direkter massenspektrometrischer Nachweis resistenzvermittelnder Proteine

Zunächst wurden Versuche unternommen, resistenzvermittelnde Proteine direkt massenspektrometrisch nachzuweisen, so z.B. das Penicillin-Bindeprotein PBP2a von methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*. Eine schnelle Zuordnung eines Klon zum empfindlichen oder resistenten Typ ist von großer Bedeutung nicht nur für die Krankenhaushygiene, sondern auch für die Behandlung des Patienten, von dem dieser Stamm isoliert wurde. Die gefundenen Unterschiede im Peakmuster waren jedoch Ausdruck eben dieser Klonalität und konnten nicht speziellen Proteinen als „Biomarker“ zugeordnet werden^{22,28,29}. Bei bestimmten Betalaktamasen von Vertretern der *Enterobacteriaceae* gelang der massenspektrometrische Nachweis der Enzyme³⁰. Allerdings bringt das Verfahren für die Routinediagnostik bei einer Zeit bis

zum Ergebnis von 22 Stunden keine Zeitvorteile gegenüber konventionellen Resistenztestungen.

1.4.4.2. Zuordnung zu klonalen Linien resistenter Stämme

Tatsächlich ist es möglich, Unterschiede im Proteinspektrum herauszuarbeiten, die typischerweise Methicillin-empfindliche von –resistenten Klonen trennen. Durch Abgleich der Profile gelang es, Patientenproben der einen oder anderen Linie zuzuordnen. Diese Herangehensweise erfasst allerdings nicht den tatsächlichen Phänotyp, da Bakterien resistenzvermittelnde Plasmide sowohl gewinnen, als auch verlieren können, was zu Fehlklassifikationen führt³¹⁻³⁴.

1.4.4.3. Der β -Laktamase Assay: Nachweis eines Resistenzmechanismus

Im nächsten Schritt gelang der Nachweis eines Resistenzmechanismus, nämlich des Vorhandenseins von β -Laktamasen. Hierbei wurde die Veränderung der Masse der Zielproteine (antibiotisch wirksame Moleküle) wegen chemischer Modifikation durch die resistenzvermittelnden Enzyme detektiert.

β -Laktamasen sind Enzyme, die β -Laktamantibiotika spalten und somit inaktivieren können. Dies stellt einen sehr häufigen Resistenzmechanismus gegen diese Antibiotikaklasse dar. Es handelt sich dabei um eine Hydrolyse des Laktam-Ringes, der antibiotisch wirksamen Molekülkomponente, woran sich weitere spontane chemische Reaktionen zur Bildung einer stabilen Form anschließen können. Diese Spaltprodukte lassen sich als Massenverschiebungen im Spektrum erfassen und somit nachweisen. Der Krankheitserreger wird hierfür mit dem entsprechenden Antibiotikum eine bis drei Stunden ko-inkubiert und nach einem Zentrifugationsschritt wird der Überstand neben einer Positiv- und Negativkontrolle auf das Target aufgetragen. Werden bei der Probe nur die Peaks detektiert, die die antibiotische Substanz (Ausgangsmolekül) repräsentieren, bedeutet das, dass es sich um ein Isolat handelt, welches keine β -Laktamase produziert. Erscheinen im Massenspektrum mehrere Massensignale entsprechend der verschiedenen Abbauprodukte, ist eine β -Laktamase im Ansatz vorhanden³⁵⁻⁴⁰. Trotz der methodischen Einschränkung, dass nur dieser Resistenzmechanismus detektiert werden kann, arbeiten diverse Arbeitsgruppen wegen der klinischen Bedeutung von v.a. Carbapenemasen am Einsatz an echten Patientenproben⁴¹⁻⁴³.

1.4.4.4. Funktionelle Ansätze

Die darauf folgende Weiterentwicklung war ein Umdenken hin zu funktionellen Ansätzen, welche im Folgenden beschrieben sind.

1.4.4.4.1. Der SILAC-Assay: Detektion metabolischer Aktivität

Eine der Ideen für einen funktionellen Testansatz ist die Detektion der Inkorporation schwerer Isotope von Aminosäuren in die Proteine metabolisch aktiver Bakterien und des *peak-shifts*, der dadurch resultiert. Dieser aktive Einbau als Zeichen der aktiven Proteinbiosynthese ist als Lebenszeichen von Bakterien und – in Gegenwart von Antibiotika – als Resistenz des Bakteriums gegen dieses Antibiotikum zu werten.

Der oben beschriebene Betalaktamase-Assay hat den Nachteil, dass nur ein Resistenzmechanismus und nur die Klasse der β -Laktamantibiotika abgedeckt sind. Deshalb war der nächste Entwicklungsschritt der SILAC (*stable isotope labeling amino acid*) Assay. Mithilfe dessen sollen Veränderungen im Proteinspektrum unter Einfluss der antibiotischen Substanzen detektiert werden. Dabei werden Aminosäuren, die mit stabilen, nicht radioaktiven, schweren Isotopen markiert sind, z.B. hier $^{13}\text{C}_6$ -Lysin (Lysin-6), dem Medium zugegeben und deren Einbau in neusynthetisierte Proteine massenspektrometrisch registriert.

Es werden mindestens drei Ansätze benötigt. Das Medium in Ansatz A enthält keine Isotopen-markierte Aminosäuren (Lysin-0). Nach Ablauf der Inkubationszeit wird ein Peakprofil aufgezeichnet, das auch zur Identifikation dienen kann. Einem zweiten Ansatz B wird anstelle normalen Lysins (Lysin-0), mit stabilen Isotopen markiertes Lysin (Lysin-6) beigelegt. Ein vitaler, Stoffwechsel betreibender Erreger, wird dieses „schwere“ Lysin in seine Zellproteine einbauen. Dieser Einbau führt zu einer Massenverschiebung im Proteinspektrum (um 6 Dalton pro Einbau einer Lysin-6 Aminosäure im Protein), die mittels MALDI-TOF detektiert werden kann. In den dritten Ansatz C werden nun das „schwere“ Lysin (Lysin-6) und die interessierende antibiotische Substanz gemeinsam eingebracht und das resultierende Spektrum mit den beiden anderen verglichen. Sieht es aus wie das gewöhnliche Erregerprofil, wurde das isotopenmarkierte Lysin nicht eingebaut, sondern es wurde die schon vorhandene Proteinausstattung gemessen. Das Antibiotikum konnte also einen weiteren Metabolismus (Proteinbiosynthese, Wachstum) verhindern und es handelt sich um einen empfindlichen Stamm. Wenn im Ansatz C jedoch doppelgipfelige Peaks auftreten,

also neue Proteine mit Integration des schweren Lysins synthetisiert wurden, ist das Isolat gegenüber der Substanz resistent ^{44,45}.

1.4.4.4.2. Empfindlichkeitsprüfung bei Pilzen

Das Prinzip des Vergleichs von Proteinprofilen unter verschiedenen Bedingungen wurde auch für Pilze der Spezies *Candida* und *Aspergillus* verfolgt. Es konnten empfindliche Erreger durch veränderte Spektren unter Einfluss antimykotischer Substanzen von resistenten unterschieden werden, ohne den Umweg über isotopenmarkierte Aminosäuren ^{46,47}.

1.4.4.4.3. MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA)

Auch bei der in dieser Arbeit untersuchten, neuen Methode handelt es sich um einen funktionellen, phänotypischen Ansatz zur schnellen Resistenztestung. Diese wird im Methodenteil (Kapitel 2.2.2) detailliert dargestellt.

1.5. Ziele der vorliegenden Arbeit

Das zunehmende Auftreten resistenter und multiresistenter Krankheitserreger bei Patienten stellt die behandelnden Ärzte vor eine große Herausforderung ⁴⁸. Die effektive Behandlung von Infektionskrankheiten wird so zunehmend schwieriger. Verlässliche und vor allem schnellere Antibiotikaresistenztestung ist folglich von großem Interesse. Das gilt ganz besonders für die Behandlung schwer kranker Patienten beispielsweise mit einer Sepsis, also einer systemischen Infektion der Blutbahn. Die konventionellen Methoden benötigen eine Bebrütungszeit von 16-20 Stunden ¹³. Die schnellsten automatisierten Systeme brauchen mindestens eine fünfstündige Inkubation und das nur bei schnell wachsenden Spezies und bestimmten Substanzen ⁴⁹.

Die MALDI-TOF MS ist eine gebräuchliche Analysetechnik zur Identifizierung von Krankheitserregern in der mikrobiologischen Routinediagnostik. Es wäre wünschenswert, diese ohnehin in den Laboren vorhandene, schnelle, akkurate und effiziente Technik auch zur Resistenzbestimmung einsetzen zu können. Jeder der bisher verfolgten Ansätze hat gewisse Limitationen. Um im Alltagsbetrieb bestehen zu können, sollte ein neuer Resistenztest jedoch für alle denkbaren Begebenheiten ein-

gesetzt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer, semi-quantitativer Test zur Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF MS an echten Patientenproben in Form von positiven Blutkulturen evaluiert und für diese Anwendung optimiert. In der Theorie ist dieser für alle Fragestellungen anwendbar, ohne Restriktionen hinsichtlich der Bakteriengattung, des Resistenzmechanismus oder des Wirkmechanismus der verschiedenen Antibiotikaklassen. Es wurden insgesamt 123 positive Blutkulturen mit der neuen Methode - und zur Bewertung parallel mit einer gebräuchlichen und robusten konventionellen Testform der Routinediagnostik (MHK-Teststreifen) - untersucht und die Ergebnisse anschließend verglichen. Es wurden nur Proben mit Gram-negativen Stäbchenbakterien im Grampräparat in die Studie aufgenommen, welche üblicherweise für die fulminant verlaufenden Sepsitiden verantwortlich sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Es wurden insgesamt 123 Proben aus Blutkulturflaschen vom Klinikum der Universität München getestet, sobald die Erreger in der Gramfärbung unter dem Mikroskop als Gram-negative Stäbchen identifiziert worden waren. Die genaue Klassifizierung der Bakterienspezies wurde anschließend mithilfe MALDI-TOF massenspektrometrisch vorgenommen.

Die Optimierung des Versuchsprotokolls erfolgte im Vorfeld an Subkulturen verschiedener Vertreter der *Enterobacteriaceae* aus der laboreigenen Stammsammlung.

2.1.1.1. Ethikvotum

Im Vorfeld war eine Anfrage an die Ethik-Kommission gestellt worden, wie mit vorliegender Studie zum Methodenvergleich zu verfahren ist - mit dem Ergebnis, dass es keines Ethik-Votums bedarf. Die Einschätzung erfolgte durch den Vorsitzenden der Ethik-Kommission auf der Grundlage, dass für diese Studie das Messprinzip im Vordergrund steht und es sich um eine reine Labortest-Vergleichsstudie handelt. Die Proben wurden nicht extra für diese Arbeit gewonnen, sondern im Rahmen der Routinediagnostik eingesendete Blutkulturen anonymisiert verwendet, die sonst verworfen worden wären. Auch wurden für die Auswertung des laborinternen Methodenvergleichs patientenbezogene Daten nicht benötigt und somit auch nicht erhoben.

2.1.2. Nährmedien und Platten zur bakteriellen Kultivierung

2.1.2.1. Agarplatten

Zur konventionellen Resistenztestung am Folgetag und zur Archivierung der verwendeten Stämme wurden selbige über Nacht bei 35 °C und 5 % CO₂ auf BD Columbia Agar mit 5 % Schafsblut (BD, Heidelberg, Deutschland) angezüchtet.

Die Resistenztestung mittels MHK-Teststreifen wurde auf BD Mueller-Hinton II Agar (BD, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

2.1.2.2. *Flüssigmedien*

Zur kulturellen Anzucht im Patientenblut befindlicher Erreger wurden Resin-haltige BD BACTEC™ PLUS – Aerob/F – Blutkulturflaschen verwendet, und die entsprechenden Flaschen für Anaerobier. Einzelne Proben aus der Kinderklinik wurden in BD BACTEC™ – PEDS – Plus/F – Medium bebrütet. Die Inkubation wurde innerhalb von sechs Stunden nach der Beimpfung der Flaschen in einem BD BACTEC™ FX Kultursystem (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) begonnen.

Um mit dem in dieser Arbeit beschriebenen, neuen Testverfahren gleich den Anforderungen der EUCAST gerecht zu werden, wurden die Ansätze mit modifiziertem Mueller-Hinton-Medium (BD Phoenix™ AST – Bouillon) hergestellt.

2.1.3. **Antibiotika**

Die zu untersuchenden antibiotischen Substanzen wurden in Konzentrationen eingesetzt, die an die klinischen Grenzwerte der EUCAST angelehnt sind ⁵⁰. In dieser Arbeit wurde zur schnellen Resistenzbestimmung die neue Methode *MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay* (MBT-ASTRA) untersucht, welche unter Kapitel 2.2.2 ausführlich beschrieben ist. Als MBT-ASTRA Screening-Breakpoint wurde der klinische EUCAST-Grenzwert für Resistenz des jeweiligen Antibiotikums herangezogen – konnte Wachstum trotz Gegenwart des Antibiotikums detektiert werden, liegt also die minimale Hemmkonzentration des getesteten Isolates oberhalb dieses Grenzwertes, konnte Resistenz nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration in mg/L	Hersteller
Cefotaxim	2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Schnelldorf, Deutschland
Ciprofloxacin	1	Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Langenhagen, Deutschland
Piperacillin/Tazobactam	16	Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Langenhagen, Deutschland

Pfaller et al. konnten in ihrer größer angelegten Studie bestätigen, dass der Einsatz eines fixen Verhältnisses (8:1) von Piperacillin zu Tazobactam im Vergleich zu einer fixen Tazobactam-Konzentration (4 µg/mL) bei der Testung Gram-negativer Bakterien vergleichbare Ergebnisse liefert ⁵¹. Die verfügbaren Daten zur Pharmakokinetik unterstützen beide Testoptionen. Das klinische Präparat kombiniert die Substanzen in einem Verhältnis von 8:1. Um den in vivo-Bedingungen näher zu sein, wurde in dieser Studie das fixe Verhältnis angewendet.

Es wurde jeweils täglich frisch aus einem mg Antibiotikum mit einem mL HPLC-Wasser (CHROMASOLV[®]; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) eine Stocklösung hergestellt. Von dieser wurde, je nach gewünschter Endkonzentration, die errechnete Menge dem entsprechenden Ansatz hinzugefügt.

2.1.4. MHK-Teststreifen

Die Minimalen-Hemmkonzentration (MHK) wurde für jedes Isolat und Antibiotikum mithilfe von MHK-Teststreifen ermittelt. Dafür wurden die MIC Test Strips der Firma bestbion dx GmbH (Köln, Deutschland) für die Substanzen Cefotaxim, Ciprofloxacin und Piperacillin/Tazobactam verwendet.

2.1.5. Hilfsmittel bei der Erreger-Aufreinigung

Zur Extraktion der Krankheitserreger aus der Blutkulturflüssigkeit, wie nachfolgend im Methodenteil beschrieben, wurden die 8,5 mL Serumröhrchen zur venösen Blutent-

nahme BD Vacutainer[®] SST[™] II Advance der Firma Becton, Dickinson (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Vor der Lyse der Zellen zur Gewinnung der intrazellulären Proteine, wurden die Bakterien mithilfe von Filterplatten (AcroPrep[™] Advance 96 Filterplatte, 0,2 µm Porendurchmesser GHP-Membran, Pall Filtersystems GmbH; Crailsheim, Deutschland) aufgefangen.

2.1.6. Chemikalien

Um die intrazellulären Proteine massenspektrometrisch messen zu können, mussten die Zellen zunächst mit 70 %iger Ameisensäure und 100 %igem Acetonitril lysiert werden. Das Acetonitril diente gleichermaßen zur Lösung und Beigabe des internen Standards und wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Wie bereits publiziert wurde zum 100 %igen Acetonitril als interner Standard RNase B (Endkonzentration 4 mg/L; Sigma Aldrich, Deutschland) hinzugegeben⁵². Gelagert wurde der Standard bei -20 °C.

100%ige Ameisensäure wurde von der Firma Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und mit destilliertem Wasser entsprechend verdünnt. Bei der MALDI-Matrix, welche zur Ionisierung der Proteine und Peptide benötigt wird, handelt es sich um α -cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (α -HCCA) von Bruker Daltonic GmbH (Bremen, Deutschland). Sie wird nach dem Standardprotokoll wie folgt angesetzt: je Milligramm Matrix werden 100 µL der Stammlösung, zu 50 % bestehend aus Acetonitril, zu 2,5 % aus Trifluoressigsäure und 47,5 % destilliertem Wasser, hinzugegeben und die Kristalle darin aufgelöst. Die gebrauchsfertige, gelöste Matrix wurde, wenn nicht in Verwendung, trocken und dunkel gelagert und das Pulver bei -20 °C verwahrt.

Trifluoressigsäure wurde bei der Firma BDH Prolabo[®] (VWR International GmbH; Darmstadt, Deutschland) bestellt und außerdem zum Säubern der MALDI-Targets verwendet. Das dafür ebenfalls benötigte Ethanol wurde von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) als >99,8 %iges reines Ethanol bezogen und je nach benötigter Endkonzentration verdünnt.

2.1.7. Technische Ausstattung

In folgender Tabelle sind die für diese Arbeit verwendeten Geräte und Softwares gelistet.

Tabelle 2: Gerätschaften der Laborräume

Geräte/Software	Name und Hersteller
Autoklav	Laboklav 160-MSLV; SHP Steriltechnik (Detzel, Deutschland)
	VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 500EC; Thermo Electron LED GmbH (Ismaning, Deutschland)
Datenverarbeitung	MS Office 10; Microsoft (Redmond, Washington, USA)
	flexControl Version 3.3; Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
	flexAnalysis 3.3; Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Gefrierschrank (-20 °C)	Profi Line; Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Inkubatoren	Heraeus B20; Heraeus (Hanau, Deutschland)
	BD BACTEC™ FX; Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Kühlschrank	Profi Line; Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
MALDI-TOF MS	Microflex LT Tischgerät mit Stickstofflaser; Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Mikropipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Multiplex-PCR, Microarray	Check-MDR CT101; Check-Points B.V. (Wageningen, Niederlande)
NanoDrop	Spektralphotometer; Thermo Scientific (Braunschweig, Deutschland)
Phoenix	Phoenix 100; Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Photometer	Ultrospec 3100; Amersham Biosciences (General Elec-

Geräte/Software	Name und Hersteller
	tric; Fairfield, Connecticut, USA)
Photometerküvetten	SEMI-MICRO-CUVETTE; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen, Deutschland)
Schüttelinkubatoren	Thermomixer compact; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Thermomixer comfort; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Statistik Software	Prototyp-Software (geschrieben mit der freien Statistik-Software R); Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Sterilbank	Heraeus HERA safe HS9; Thermo Electron Corporation (Thermo Fischer Scientific)
Stromversorger	Power Pac 200; Biorad
	Power Pac HC; Biorad
Vitek	Vitek 2; bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen, Deutschland)
Vortex TischiSchüttler	Vortex Genie 2; Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Zentrifugen	5417C; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	5417R; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Sorvall Super T21, Thermo Electron Corporation
	Heraeus Megafuge 1.0 R; Thermo Electron Corporation (Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, Deutschland)

2.1.8. Bioinformatik

Die Programme, die bei der Erzeugung, Veranschaulichung und Auswertung der Daten für diese Abhandlung zur Anwendung kamen, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die massenspektrometrischen Messungen liefen über das MALDI-Betriebssystem flexControl Version 3.3 von Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland). Die Rohdaten konnten mithilfe der Software flexAnalysis 3.3 angesehen und die Spektren

bearbeitet werden. Bei der automatisierten Auswertung kam ein Software Prototyp zum Einsatz (ebenfalls Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Deutschland).

Alle weiteren Auswertungen und Aufzeichnungen wurden mittels MS Office 10 (Microsoft; Redmond, Washington, USA) vorgenommen.

2.2. Methoden

2.2.1. *Erreger-Identifikation direkt aus der Blutkulturflüssigkeit*

Es wurden alle Blutkulturen, die werktäglich zwischen sieben und 16 Uhr positiv wurden und im Grampräparat Gram-negative Stäbchen zeigten, in die Studie eingeschlossen. Gab es sowohl aerobe, als auch anaerobe Kulturflaschen, wurde die erste, die positiv gemeldet wurde, für die Testung herangezogen. Standen von einem Patienten zum selben Zeitpunkt beide zur Verfügung, wurden diese in einigen Fällen zum Abschätzen des Einflusses der Kulturflasche parallel angesetzt.

Zur genauen Feststellung der Bakterienspezies unmittelbar aus der Blutkulturflüssigkeit wird bei Gram-negativen Stämmen in unserem Labor standardmäßig nach folgendem Protokoll vorgegangen: ein mL der erregerhaltigen Flüssigkeit wird in ein Eppendorf-tube transferiert und 200 µL des Lysepuffers aus dem Sepsityper Kit (Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Deutschland) hinzugefügt. Nach kurzem Schütteln auf dem Vortex-Tischschüttler, wird das Gefäß bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute* [rpm]) eine Minute lang zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert und verworfen. Daraufhin wird das Pellet im Waschpuffer kräftig resuspendiert und aufgelöst, bevor es erneut bei 13.000 rpm (entsprechend einer relativen Zentrifugalbeschleunigung [RZB] von 17949 x g) für eine Minute zentrifugiert wird. Nach Verwerfen des Überstandes erhält man das saubere bakterielle Pellet. Nun wird es mit 300 µL destilliertem Wasser wieder aufgenommen und anschließend werden 900 µL Ethanol hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen unter Zugabe von 30 µL 70 %iger Ameisensäure und 30 µL Acetonitril lysiert⁵³. Der Überstand dieses Zelllysates kann dann auf das MALDI-Target aufgebracht und die Massenspektren, wie im Folgenden genauer beschrieben, akquiriert werden. Die Zuordnung des Massenspektrums der Probe zur entsprechenden Bakterienspezies erfolgt automatisch nach Abgleich mit der Datenbank.

2.2.2. MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA)

Der neue Ansatz zur schnelleren Antibiotikaresistenztestung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie basiert auf einem semi-quantitativen Prinzip und stützt sich auf eine kürzlich erschienene Publikation unserer Arbeitsgruppe mit Kooperationspartnern⁵². Dabei wird das Wachstum in Abwesenheit und, in einem separaten Ansatz, in Gegenwart des zu testenden Antibiotikums detektiert und anschließend zueinander ins Verhältnis gesetzt. Im Folgenden sind die Schritte des optimierten Versuchsprotokolls dargestellt.

2.2.2.1. Extraktion der Erreger aus Blutkultur-Flaschen

Parallel zur Erreger-Identifikation wurde ebenfalls ein mL der Blutkulturflüssigkeit in ein Serumröhrchen mit Trenngel gefüllt und bei 4300 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die zellulären Bestandteile des menschlichen Blutes befanden sich unterhalb der Trenngel-Schicht, die bakteriellen Zellen und der Überstand aus Serum und Kulturmedium oberhalb. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien mit einer Pipette vorsichtig abgezogen, in destilliertem Wasser (Ampuwa® Spüllösung; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) suspendiert und in ein Eppendorfgefäß eingebracht. Sie wurden anschließend einmal mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.2.2. Vorbereitung der Ansätze und Inkubation

Die gewonnenen Zellen wurden in Mueller-Hinton-Medium mit einer optischen Dichte (OD) von ca. 0,0035 –gemessen bei 600 nm- eingimpft.

Je Ansatz wurde ein Volumen von 200 µL eingesetzt. Pro zu testendes Isolat diente ein Ansatz als Wachstumskontrolle und Bezugsgröße. In diesem konnte der Erreger ohne Zusätze frei wachsen. Je untersuchter antibiotischer Substanz gab es ein weiteres Reaktionsgefäß, in das die Substanz, wie beschrieben, entsprechend dem klinischen Grenzwert für Resistenz der EUCAST eingebracht wurde. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C und 950 rpm für drei Stunden im Schüttelinkubator bebrütet.

2.2.2.3. *Aufbereitung zur massenspektrometrischen Analyse*

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension jedes Ansatzes in eine eigene Vertiefung der Filterplatte transferiert. Das Filtrat aus Nährmedium und ggf. Antibiotikum wurde nach der Zentrifugation bei 4000 rpm (entsprechend 3220 x g) für drei Minuten verworfen. Anschließend wurde mit je 50 µL destilliertem Wasser gewaschen, indem erneut bei 4300 rpm (entsprechend 3720 x g) für drei Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Nun wurde die Filterplatte auf eine frische Mikrotiterplatte zum Auffangen der eigentlichen Probe gesetzt. Die bakteriellen Zellen wurden mit je zehn µL 70 %iger Ameisensäure und zehn µL Acetonitril – inklusive dem gelösten internen Standard – lysiert und die intrazellulären Proteine nach erneuter Zentrifugation aufgefangen.

Ein µL des Lysats wurde dann auf einen Spot der MALDI-Stahltarget-Platte pipettiert und nach dem Lufttrocknen bei Raumtemperatur mit einem µL MALDI-Matrix überdeckt. Das Target wurde abgedunkelt luftgetrocknet, da es sich bei der Matrix um lichtempfindliche Moleküle handelt. Jeder Ansatz wurde in Quadruplikaten gespottet und gemessen.

2.2.3. *Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF*

Nachdem auch die Matrix getrocknet war, wurde der Probenenträger in das MALDI-TOF Massenspektrometer eingeschleust und die Massenspektren generiert. Die Parameter wurden für Massen der Größenordnung 2000 bis 20000 Da angepasst und waren dieselben wie zur standardmäßigen Erregeridentifikation: Beschleunigungsspannung: 20 kV; Ionenquelle eins: 20 kV; Ionenquelle zwei: 18,6 kV; Extraktionsverzögerung: 200 ns; Linse: 6,5 kV; Detektorverstärkung: 7,4 V. Die Massenspektren wurden bei höchster Laserfrequenz von 60 Hz im positiv-linearen Bereich aufgezeichnet. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde ein externer „*bacterial test*“ Standard ([BTS] Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Deutschland) der Routinediagnostik verwendet.

2.2.4. *Konventionelle Resistenztestung*

Zur Kontrolle und Korrelation der Ergebnisse des neuen Testes mit einem etablierten Standard der konventionellen Resistenztestung wurde für jede Isolat-Antibiotikum-Kombination ein MHK-Test angelegt. Dafür wurden die Erreger von einer frischen

Übernachtskultur mit einer sterilen Impföse in isoosmotische Kochsalzlösung überführt. Es wurde unter optischer Kontrolle eine Bakteriensuspension mit einer Keimdichte von 0,5 des McFarland-Trübungsstandards hergestellt. Innerhalb von 15 Minuten wurde eine Mueller-Hinton-Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Watteträgers beimpft, nachdem überschüssige Flüssigkeit durch Drücken gegen die Reagenzglaswand entfernt wurde. Auf diese Weise wird eine übermäßige Inokulation verhindert. Durch enges Ausstreichen des Watteträgers in drei Richtungen wurde eine gleichmäßige Verteilung der Bakterienzellen erreicht. Die Teststreifen mit einer Skala zum Ablesen der MHK wurden – ebenfalls innerhalb von 15 Minuten – darauf platziert und der Wert nach 16-20 Stunden Inkubation bei 35 ± 1 °C vor einem dunklen Hintergrund registriert ¹³.

2.2.4.1. Automatisierte Testsysteme und alternative Testmethoden zum Nachweis von Resistenzgenen

Im Rahmen der Routinediagnostik wurden alle Stämme zusätzlich mit halbautomatisierten Verfahren charakterisiert.

Das Gerät „Phoenix 100“ der Firma Becton Dickinson ermöglicht die automatisierte Identifikation über biochemische Reaktionen und eine Empfindlichkeitsprüfung. Letztere basiert auf der Mikrodilutionsmethode. Über Trübung und einen Redox-Indikator wird ein auftretendes Wachstum unter Einfluss antimikrobieller Substanzen überwacht ^{54,55}.

Mit dem Check-MDR CT101 von Check-Points B.V können, basierend auf PCR und kolorimetrischer Detektion der Amplifikate, die in der Testkassette enthaltenen Resistenzgene identifiziert werden ⁵⁶. Dieses Microarray kam in einzelnen Fällen bei widersprüchlichen Messungen zum Einsatz, um den die phänotypische Resistenz vermittelnden Genotyp zu bestimmen.

2.2.5. Bestimmung der tatsächlichen Anzahl an KBE der eingesetzten Optischen Dichte

In zwei Versuchen wurde annäherungsweise die der eingesetzten optischen Dichte entsprechende Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL ermittelt. Von einem *E. coli* der hausinternen Stammsammlung wurden in doppeltem Ansatz je 50 µL der OD_{600nm} von ca. 0,0035 und einer logarithmischen Verdünnungsreihe auf

Blutagar ausplattiert und die Kolonien am Folgetag gezählt. Nach dieser Annäherung an die nötige Verdünnung, wurde der Versuch mit einem *E. coli* und einer *K. pneumoniae* der echten Patientenproben wiederholt. Hierzu wurde ein mL Bakterien-suspension der eingesetzten optischen Dichte und vierer Verdünnungsstufen in *plate-count* Agar (Merck KgaA; Darmstadt, Deutschland) eingegossen und nach 48 Stunden Inkubation ausgewertet. Das größere Volumen erlaubt dabei eine genauere Annäherung an die tatsächliche Anzahl der KBE.

2.2.6. Protein-Bradford

Um einen Anhaltspunkt dafür zu bekommen, um welche Menge Protein es sich in den Proben tatsächlich handelt, wurde eine Verdünnungsreihe einer bekannten optischen Dichte kolorimetrisch quantifiziert. Dafür wurde das Coomassie Plus (Bradford) Assay-Kit der Firma Thermo Scientific (Braunschweig, Deutschland) verwendet und die Proben mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer gemessen (Thermo Scientific; Braunschweig, Deutschland). Durch theoretische Überlegungen und Vorversuche wurde der Messbereich ein $\mu\text{g/mL}$ bis 25 $\mu\text{g/mL}$ ausgewählt. Die Standardreihe bekannter Proteinkonzentration zur Kalibrierung wurde mithilfe bovines Serumalbumins (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland) hergestellt. Für die Vermessung der Bakteriensuspensionen wurde je ein mL der Verdünnungsreihe verwendet und die Zellen durch Erhitzen auf 99 °C für zehn Minuten im Schüttelinkubator aufgeschlossen. Je nach grob zu erwartender Proteinmenge wurden die Proben anschließend verdünnt oder konzentriert und der jeweilige Faktor zum späteren Zurückrechnen vermerkt. 150 μL jedes Standards oder jeder unbekannten Probe wurden mit 150 μL des Coomassie Plus Reagenz vermischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Davon wurden drei μL zur Messung der Extinktion im Nanodrop bei 595 nm eingesetzt. Anhand der Standard-Kurve konnte die Proteinmenge pro mL der Proben ermittelt und die erforderlichen Werte errechnet werden.

2.2.7. Datenauswertung

2.2.7.1. FlexAnalysis

Die manuelle Auswertung und die Gestaltung der Abbildungen der Massenspektren wurden mithilfe der Software FlexAnalysis vorgenommen. Ebenso konnten bei nicht Übereinstimmung von konventioneller und MALDI-TOF Testung, Ergebnissen nahe der Grenzwerte und Messproblemen, die Rohdaten eingesehen und nach einer möglichen Erklärung gesucht werden. Dafür wurden zunächst die Rohspektren geebnet und die Messbasislinie subtrahiert³⁹. Dann konnten die in den Massenspektren der verschiedenen Ansätze aufgetretenen Peaks verglichen und auch die Intensitätsunterschiede der Ausschläge analysiert werden.

2.2.7.2. Software-Prototyp

Unter dem Aspekt, dass der Test langfristig routinetauglich sein muss, um im klinischen Alltag bestehen zu können, wurde zur vereinfachten automatisierten Auswertung eine Prototyp-Software (geschrieben in der freien Programmiersprache R) verwendet⁵⁷. Dabei wird stellvertretend für das „Relative Wachstum“ (RG= *relative growth*) ein Wert berechnet. Je nach dessen Lage zum Cut-off, erfolgt die Klassifikation als resistent oder empfindlich.

Die Massenspektren werden hierfür zunächst auf den höchsten Intensitätswert normalisiert^{52,58}. Der resultierende relative Intensitätsbereich zwischen null und eins wird anschließend in 100 verschiedene Reizschwellen mit einem Abstand von je 0,01 unterteilt. Eine Peak-Auswahl wird vorgenommen und die absolute Anzahl an Peaks über jedem einzelnen Schwellenwert wird addiert. Die Summe wird dann gegen den jeweiligen Grenzwert aufgetragen.

Für jeden gemessenen Ansatz wird anhand der Fläche unter der Kurve des Massenspektrums (*area under the curve* [AUC]) ein Wert ermittelt, der das „absolute Wachstum“ widerspiegelt. So kann das Wachstum unter Antibiotika-Einfluss unmittelbar mit dem Kontrollansatz verglichen werden.

Objektiver kann das Ausmaß des Wachstumsunterschiedes abgebildet werden, indem man das Wachstum in Gegenwart des Antibiotikums zur Bezugsgröße (Kultur in MH-Medium ohne Zusätze) ins Verhältnis setzt. Der errechnete Wert spiegelt das relative Wachstum wider: $RG = AUC_{MH/Antibiotikum} / AUC_{MH}$.

Das RG wurde für jede Kombinationsmöglichkeit der Messungen berechnet, d.h. bei jeweils vier Messungen mit und ohne Zusatz einer antibiotischen Substanz, ergeben sich 16 Werte, die in einem Boxplot-Diagramm zusammengefasst dargestellt werden. Aufgrund von Vorversuchen wurde der Cut-off bei 0,4 festgelegt⁵². Lag das Ergebnis der getesteten Isolat-Antibiotikum-Kombination darüber, wurde der Erreger als resistent gewertet. Lag es darunter, wurde er als empfindlich eingestuft^{52,58}.

Für den Kontrollansatz gibt es eine Schwelle minimalen Wachstums, die überschritten werden muss, damit das Ergebnis als auswertbar eingestuft werden kann. Zu geringes Wachstum im Referenzansatz könnte zu einem zu kleinen Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Antibiotikum und folglich zu vermehrt falsch resistenten Ergebnissen führen, wenn das Wachstum des eigentlichen Testansatzes darauf normalisiert wird. Ein zu geringes Wachstum des Kontrollansatzes wurde in diesem Probenkollektiv jedoch nie als Ursache falsch resistenter Ergebnisse identifiziert.

2.2.7.3. Graphische Darstellungsmöglichkeiten

Nachfolgende Abbildung soll zusammengefasst die beschriebenen Prinzipien der Daten-Visualisierung und deren Zusammenhang veranschaulichen.

Abgebildet ist der Auswertungsvorgang an dem Beispiel eines gegen Ciprofloxacin resistenten und Cefotaxim-empfindlichen Isolates. Die erhaltenen Massenspektren der Ansätze mit der jeweiligen zu testenden antibiotischen Substanz (Ansatz A und C) werden mit dem Referenzspektrum der Wachstumskontrolle (Ansatz B, Anzucht nur in Kulturmedium) verglichen. Da in ihrem Wachstum nicht inhibiert, zeigen die resistenten Erreger ein der Kontrolle ähnliches Spektrum (A). Bei empfindlichen Stämmen kann nur der zugegebene interne Standard detektiert werden (C).

Zur erleichterten automatisierten Auswertung wurde eine Prototypsoftware verwendet. Über die Fläche unter der Kurve (*area under the curve* [AUC]) wird ein Wert ermittelt, der das absolute Wachstum des Erregers repräsentiert. Dies kann nur in einem Bereich erfolgen, in dem die Signalstärke noch nicht den Sättigungswert erreicht hat und eine Korrelation zwischen Peak-Intensität und Proteinmenge angenommen werden kann. Das Ergebnis eines Messansatzes kann auch nur dann valide beurteilt werden, wenn das Wachstum im Kontrollansatz die Schwelle von 0,05 überschreitet („Minimalanforderung“). Ist dies nicht der Fall, wird die entsprechende Box im Diagramm des nachfolgenden Schrittes rot gekennzeichnet. Eine übersichtlichere Beurteilung, v.a. bei mehreren Substanzen gleichzeitig, ist besser im Modus des relativen

Wachstums möglich (relative growth [RG]). Hierbei wird der AUC-Wert jedes Ansatzes mit Antibiotikum zum Referenzwert des Kontrollansatzes ins Verhältnis gesetzt. Das Isolat wird gegenüber der entsprechenden Substanz als resistent klassifiziert, wenn das Verhältnis oberhalb des empirisch festgelegten Cut-off-Wertes von 0,4 liegt ⁵². Liegt es darunter, handelt es sich um einen empfindlichen Stamm.

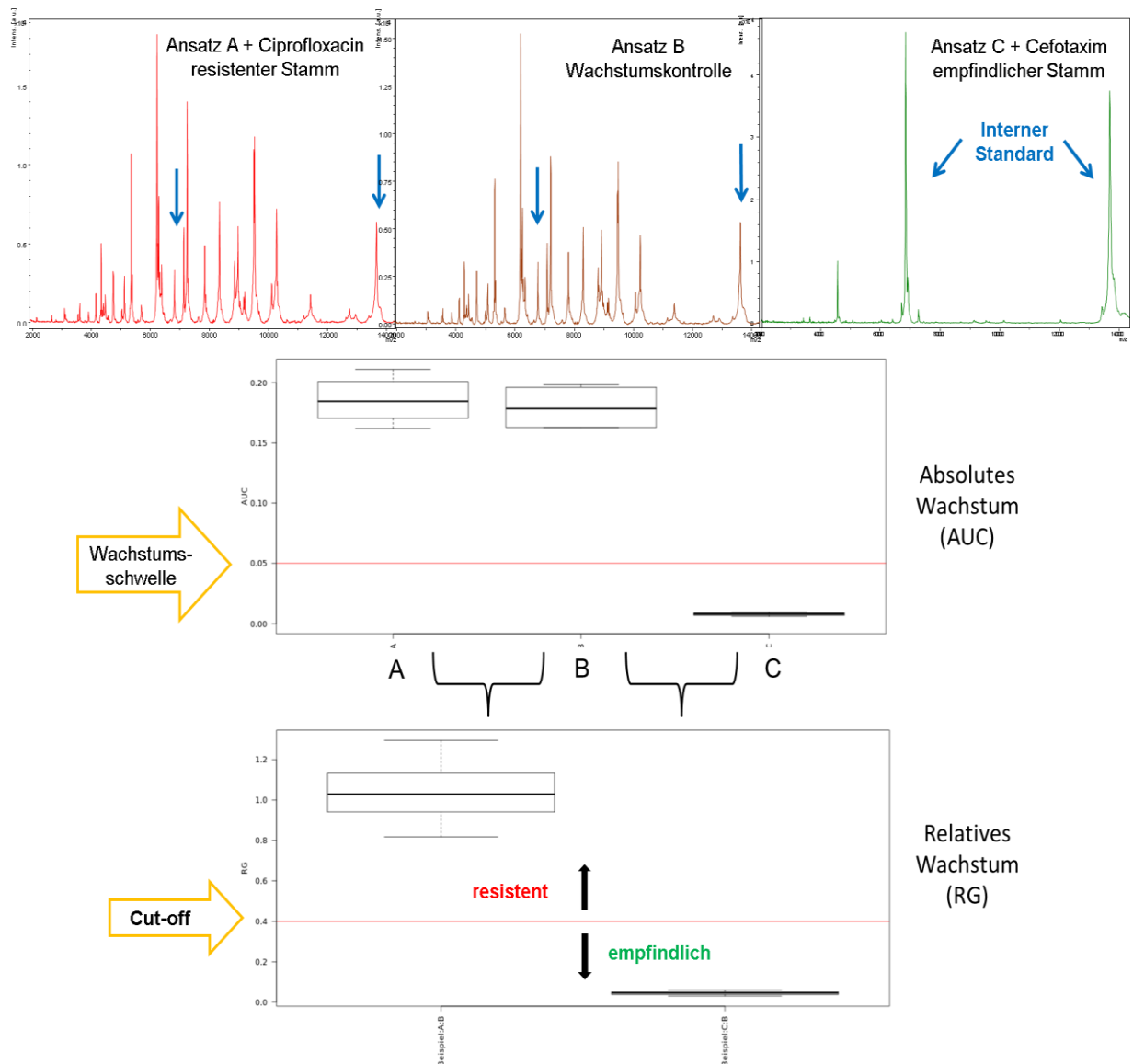


Abb. 2. Exemplarische Darstellung des Auswertungsvorganges. Abgebildet ist ein gegen Ciprofloxacin resistentes und Cefotaxim-empfindliches Isolat. Die Massenspektren werden durch die Prototyp-Software in ein Boxplot-Diagramm übersetzt. Dabei veranschaulichen die Boxen den Interquartilsabstand, also den Bereich, in dem 50 % der Werte liegen, und die dicke Linie innerhalb dieser Kästen den Median. Die Antennen zeigen die Minima und Maxima an, mögliche Ausreißer werden gesondert markiert.

3. Ergebnisse

3.1. Austitration der optimalen Einsaat-Dichte

Der Konzentrationsbereich, in dem ein annähernd lineares Verhältnis zwischen Proteinkonzentration und Signalstärke, d.h. Peak-Intensität, besteht, wurde initial mit Hilfe des Bradford-Testes ermittelt. Es wurde eine Verdünnungsreihe der zu erwartenden optischen Dichte herangezogen und gemessen. Wie in nachfolgendem Schaubild dargestellt, ergab sich ein linearer Bereich bis zu einer optischen Dichte von 0,12 (Proteinkonzentration ca. 6,5 µg/mL) und einem AUC-Wert von ca. 0,17. Das bedeutet, dass jenseits dieser Werte, eine Zunahme der optischen Dichte, also der bakteriellen Zellzahl und Proteine, zu keiner messbaren Zunahme der Peak-Intensität und somit der AUC führt. Es kommt zu einer scheinbaren Sättigung des Systems, in dem Wachstumsunterschiede nicht mehr diskriminiert werden können. Um mit vorliegender semiquantitativer Methode valide Aussagen treffen zu können, müssen die Messungen im linearen Bereich erfolgen.

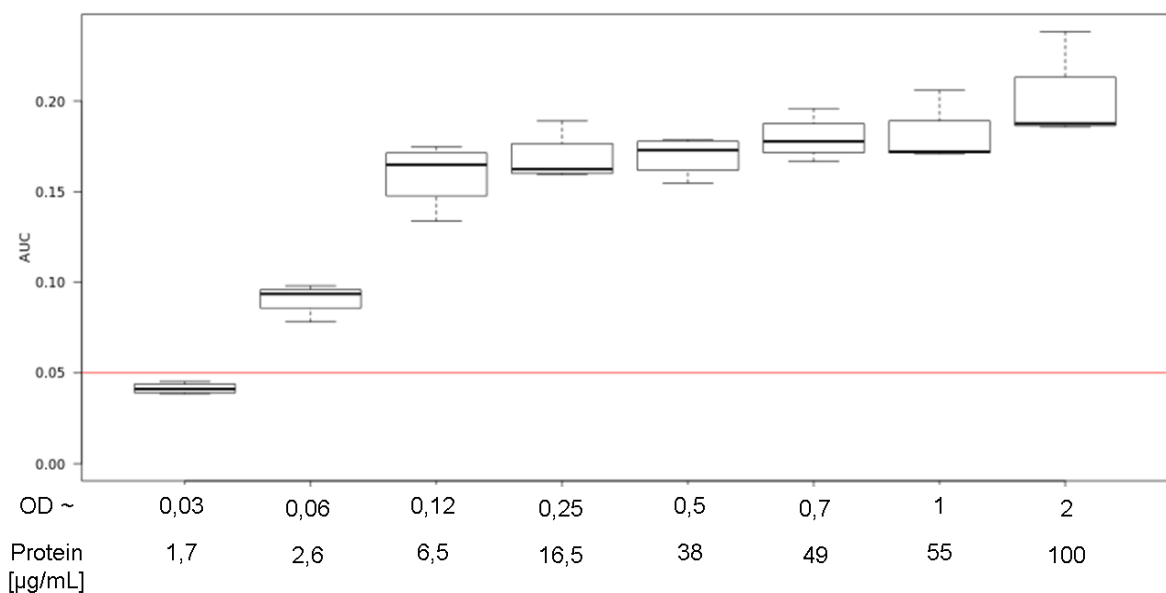


Abb. 3. Verdünnungsreihe. 200 µL der Bakteriensuspensionen verschiedener optischer Dichten wurden entsprechend des Protokolls lysiert, die Massenspektren generiert und – hier dargestellt – das „absolute Wachstum“ mithilfe der Auswertungssoftware veranschaulicht. Ebenfalls aufgeführt ist die jeweilige Proteinkonzentration in µg/mL, die der Bradford-Test dieser Verdünnungsreihe ergab.

Zur Gegenüberstellung sind im Folgenden die entsprechenden Massenspektren abgebildet. Wie oben beschrieben, ist die Sättigung ab einer OD von ca. 0,12 erreicht. Die Intensität des Standard-Peaks unterliegt noch einer gewissen Dynamik, scheint aber von der Software nicht widergespiegelt zu werden. Mehr Protein bedeutet mehr Konkurrenz um Ionisation. Dies kommt in der Abnahme des internen Standards zum Ausdruck, welcher immer in einer festen, bekannten Konzentration allen Ansätzen hinzugegeben wird. Als Zielwert nach Ablauf der Inkubationszeit wurde demnach eine optische Dichte im Bereich zwischen 0,12 und 0,25 angestrebt (vgl. hierzu auch Kapitel 2.2.7).

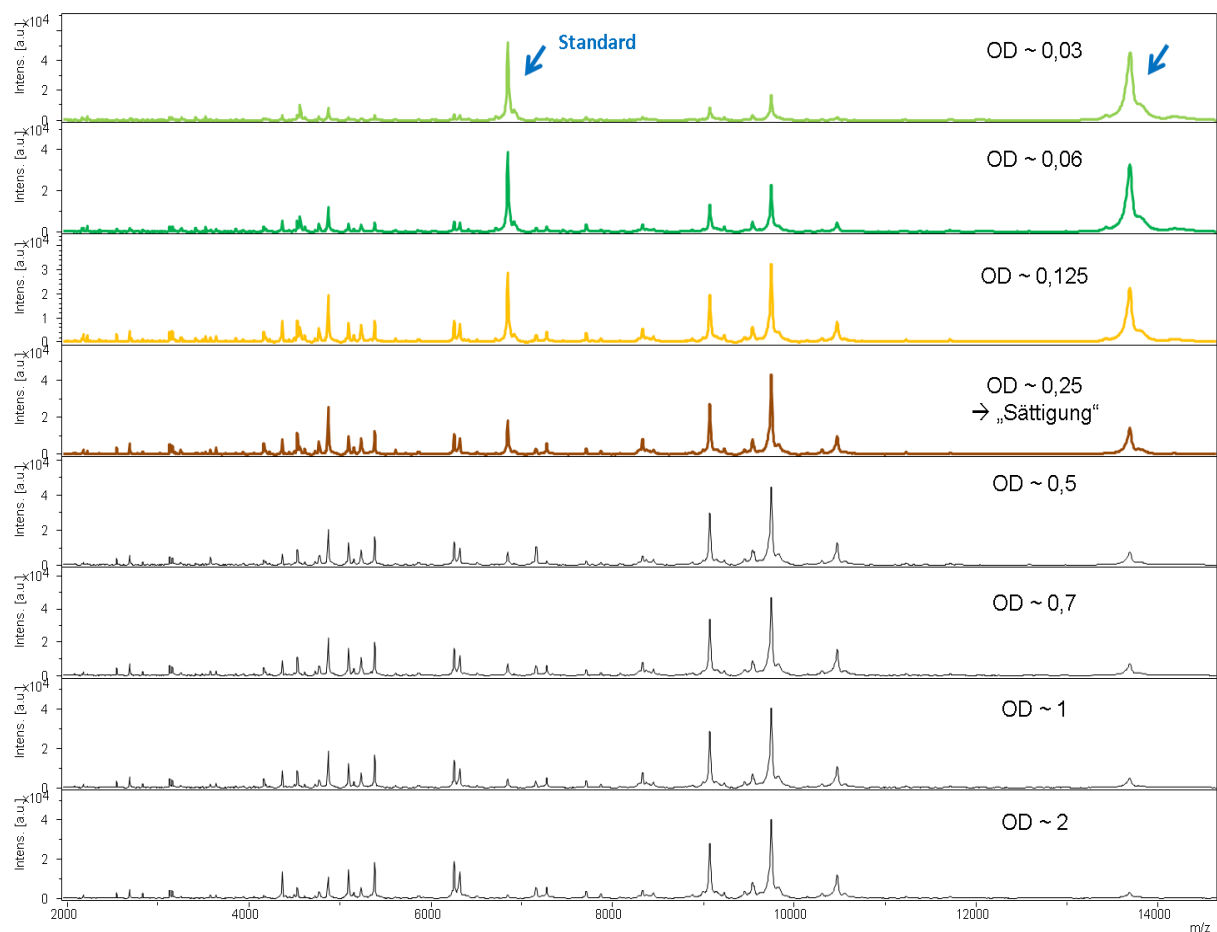


Abb. 4. Korrelation der eingesetzten optischen Dichte mit dem resultierenden Massenspektrum. Es wurden, wie unter den Versuchsbedingungen, 200 μ L der Probe unter Zugabe des internen Standards aufbereitet und gemessen. Die Zusammenschau der Abbildungen 3 und 4 ergibt einen Zielkorridor zwischen $OD_{600nm} = 0,12$ und $OD_{600nm} = 0,25$.

Obwohl schon bei einer optischen Dichte von 0,03 kaum bakterielle Proteine im Massenspektrum nachweisbar sind (vgl. Abb. 4), scheint es dennoch zu viel Ausgangsmaterial darzustellen. In Abbildung 5 ist exemplarisch an einem empfindlichen Isolat gezeigt, dass bei einer zu hohen Ausgangsdichte das Wachstum trotz der Ge-

genwart von Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam so gut ist, dass der Stamm fälschlicher Weise als resistent klassifiziert würde. Erst bei einer anfänglichen optischen Dichte von ca. 0,004 gelingt eine korrekte Zuordnung.

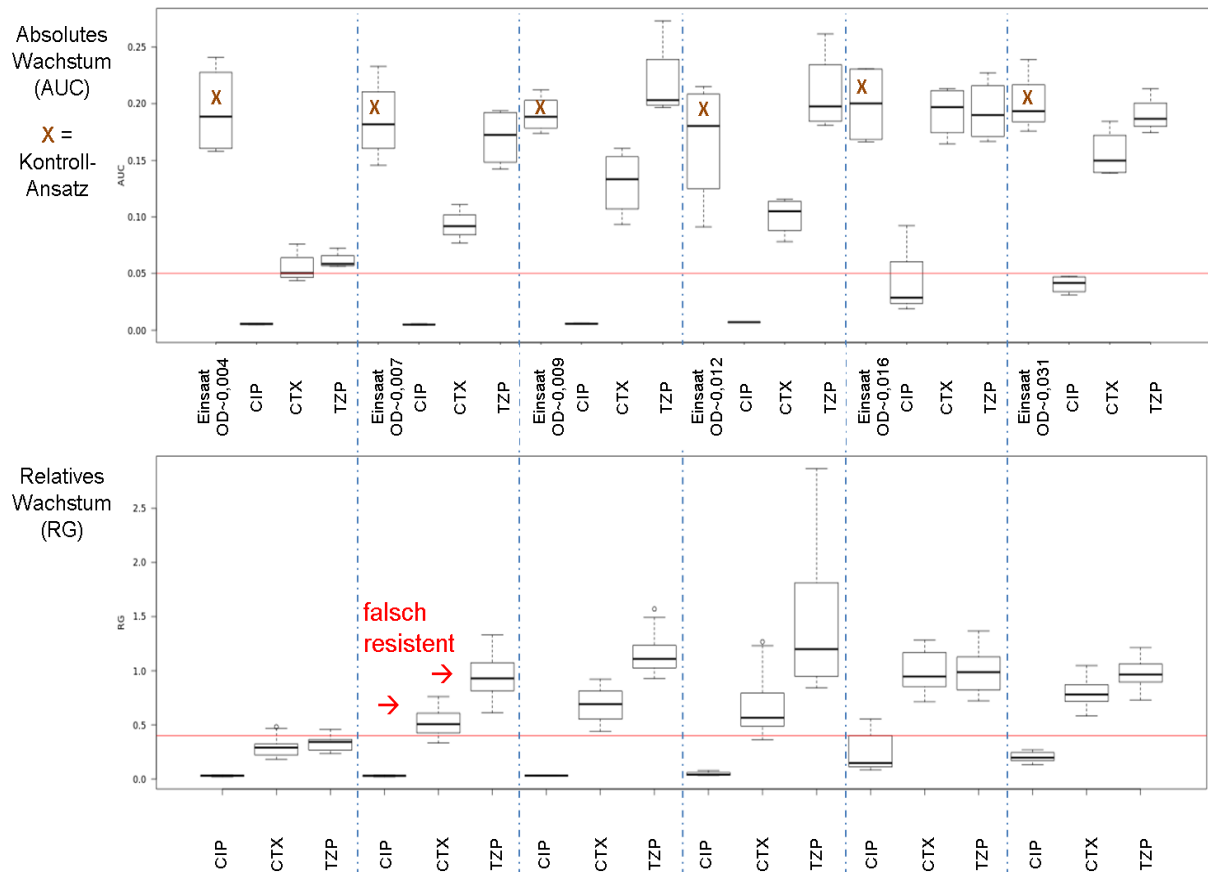


Abb. 5. Testreihe unterschiedlicher Einsaat-Dichten eines voll empfindlichen Isolates. **Oben:** Absolutes Wachstum im Kontrollansatz und unter Einfluss der drei untersuchten antibiotischen Substanzen. **Unten:** relatives Wachstum und Lage zum Cut-off. Nach dreistündiger Inkubation gelingt nur bei einer anfänglichen Einsaat von OD_{600nm}= 0,004 ein ausreichend großer Wachstumsunterschied zur korrekten Klassifizierung.

Bei den Titrationsversuchen zur Bestimmung der geeigneten Einsaat zeigte sich eine Tendenz zur falsch resistenten Zuordnungen. Um diesem Problem zu begegnen, ist bei empfindlichen Stämmen ein großer Wachstumsunterschied zwischen Kontrollansatz und eigentlicher Probe nötig. Deshalb entschieden wir uns für eine möglichst geringe anfängliche Zelldichte bei längerer Inkubationszeit (drei Stunden) zugunsten eindeutigerer Ergebnisse.

Als probatorischer MBT-ASTRA Screening-Breakpoint wurde die Konzentration des klinischen Grenzwertes für Resistenz gewählt. Da die richtige Klassifikation empfindlicher Isolate bereits bei dieser Konzentration gelang (wie nachfolgend exemplarisch an zwei empfindlichen Isolaten dargestellt), sahen wir vom Einsatz einer beschriebe-

nen höheren Konzentration ab, um die Wahrscheinlichkeit des **major-Fehlers** einer falsch-empfindlichen Zuordnung möglichst gering zu halten (vgl. hierzu auch Kapitel 4.3.1). Es ist die Ansicht des „absoluten Wachstums“ gewählt, um die nicht signifikanten, minimalen Unterschiede in der Wachstumsdetektion in der direkten Gegenüberstellung vergleichen zu können. Die rote Linie markiert die „Mindestanforderung“ an Wachstum für den Kontrollansatz. Als Ergebnis hatte diese Messung eine korrekterweise voll-empfindliche Zuordnung für beide Isolate ergeben.

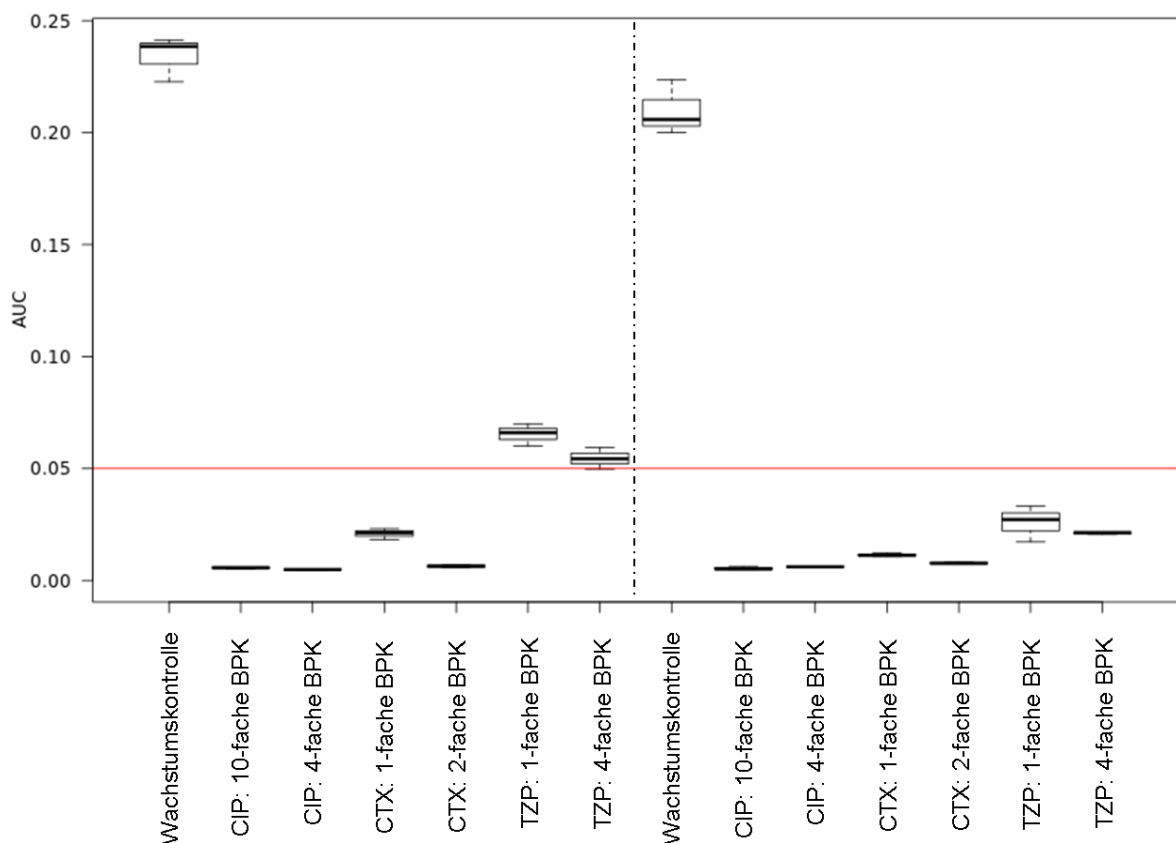


Abb. 6. Testung unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen. BPK= Breakpoint-Konzentration; CIP= Ciprofloxacin; CTX= Cefotaxim; TZP= Piperacillin/Tazobactam. In dieser Abbildung ist das absolute Wachstum von zwei voll empfindlichen Isolaten gezeigt, die in parallelen Ansätzen unterschiedlich hohen Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt waren. Die korrekte Klassifikation empfindlicher Isolate gelingt bereits bei Einsatz der exakten Breakpoint-Konzentration für Resistenz.

Durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen konnte ermittelt werden, dass die zu Beginn des Versuches inokulierte optische Dichte (OD_{600nm} ca. 0,0035) ungefähr einer Konzentration von 2×10^6 KBE pro mL entspricht.

3.2. Analyse positiver Blutkulturen

Der semi-quantitative Test wurde an 104 aufeinander folgenden Patientenproben (Blutkulturen) evaluiert. Zur Abschätzung der Inter-Assay-Variabilität wurden in 14 Fällen zwei parallel eingesandte BK als Doppelbestimmung getestet.

Unter den 104 klinischen Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* befanden sich in absteigender Reihenfolge 61 *Escherichia coli*, 18 *Klebsiella pneumoniae*, neun *Enterobacter cloacae*, drei *Klebsiella oxytoca*, zwei *Enterobacter aerogenes* zwei *Citrobacter freundii*, zwei *Serratia marcescens* und jeweils ein *Aeromonas sp.* und eine *Salmonella enterica* Serovar Typhi. Außerdem vier Isolate der Art *Pseudomonas aeruginosa* und ein *Acinetobacter baumannii*.

3.2.1. Cefotaxim

Im Folgenden sind die Ergebnisse für das Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim veranschaulicht.

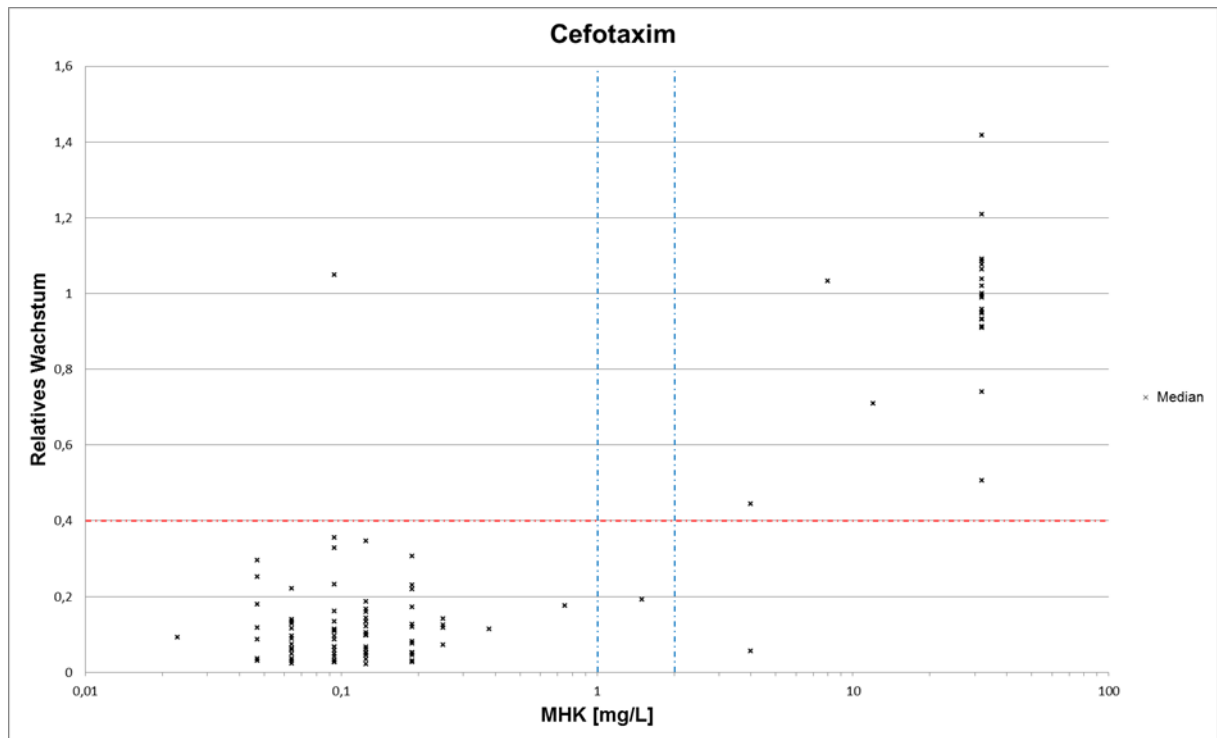


Abb. 7. Analyse der Resistenzlage von 104 Blutkulturen septischer Patienten für Cefotaxim. Die Werte des MHK-Teststreifens (X-Achse) sind für jeden Stamm gegenüber dem Median der Werte für das relative Wachstum aus der MBT-ASTRA-Prototypsoftware (Y-Achse) aufgetragen. Die rote gestrichelte Linie bei 0,4 markiert den Grenzwert, der im MBT-ASTRA-Test resistente von empfindlichen Erregern unterscheidet. Die blauen Geraden zeigen die zwei EUCAST-Grenzwerte an: bei einer MHK kleiner oder gleich ein mg/L handelt es sich um ein empfindliches, ab einer MHK von größer 2 mg/L um ein resistentes Isolat. Liegt der Wert dazwischen, wird es als intermediär klassifiziert. Außer bei einem empfindlichen und einem resistenten Stamm, gelang eine übereinstimmende Zuordnung. Ein intermediärer Stamm wurde als empfindlich eingestuft.

In nur einem Fall wurde ein Isolat mit Hilfe der Auswertungssoftware fälschlicher Weise als resistent klassifiziert. Bei der händischen Auswertung wäre der Erreger als sensibel eingestuft worden.

Für die Substanz Cefotaxim wurde zwei Mal die Zuordnung „falsch-empfindlich“ getroffen, wobei es sich in einem Fall um eine K1 *Klebsiella oxytoca* handelte, mit einem intermediären Phänotyp laut Teststreifen (MHK = 1,5 mg/L). Bei der zweiten Probe zeigte sich in der konventionellen Testung eine Heteroresistenz des Isolates. Dies ist ein Problemfall, der mit dem Prinzip der MBT-ASTRA Methode nicht in geeigneter Weise erfasst und differenziert werden kann.

In der nochmaligen Testung der Reinkultur konnte eine korrekte Zuordnung erfolgen.

Der intermediäre Stamm ausgenommen, ergibt sich für die Substanz Cefotaxim eine Sensitivität von 96 % und eine Spezifität von 99 %. Die intermediäre Kategorie existiert im gewählten Setting nicht und die Zuordnung erfolgt unter den angewendeten Bedingungen in diesem Fall korrekterweise als empfindlich (siehe auch Kap. 3.2.3).

3.2.2. Ciprofloxacin

Nachfolgende Graphik zeigt die Daten für die Substanz Ciprofloxacin.

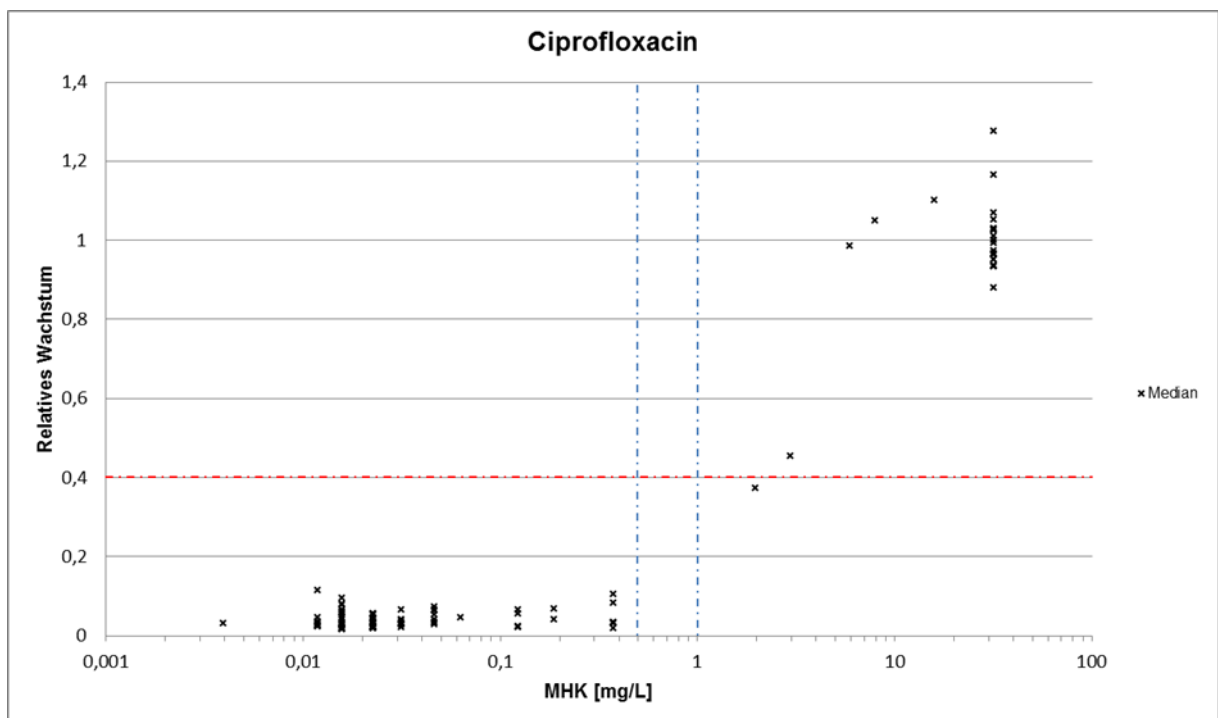


Abb. 8. Analyse der Resistenzlage von 104 Blutkulturen septischer Patienten für Ciprofloxacin. Die Werte des MHK-Teststreifens (X-Achse) sind für jeden Stamm gegenüber dem Median der Werte für das relative Wachstum aus der MBT-ASTRA-Prototypsoftware (Y-Achse) aufgetragen. Die rote gestrichelte Linie bei 0,4 markiert den Grenzwert, der im MBT-ASTRA-Test resistente von empfindlichen Erregern unterscheidet. Die blauen Geraden zeigen die zwei EUCAST-Grenzwerte an: bei einer MHK kleiner oder gleich 0,5 mg/L handelt es sich um ein empfindliches, ab einer MHK von größer ein mg/L um ein resistentes Isolat. Liegt der Wert dazwischen, wird es als intermediär klassifiziert. Außer bei einem resistenten Stamm, gelang eine Klassifikation in Übereinstimmung mit der Referenzmethode.

Bei dem Fluorchinolon gab es nur eine einzige falsche Klassifikation eines *Pseudomonas aeruginosa* als empfindlich, der im Teststreifen allerdings mit einer MHK von zwei mg/L knapp im resistenten Bereich lag. In diesem Fall konnte auch bei der Nachtestung ausgehend von der Agarplatte kein mit dem MHK-Test übereinstimmendes Ergebnis erzielt werden.

Bei der *Salmonella enterica* Seroovar Typhi handelte es sich um ein sensibles (MHK = 0,016 mg/L) Isolat, das unter den applizierten Bedingungen korrekt als solches identifiziert wurde. Allerdings gelten für diese Spezies separate EUCAST-Kriterien (empfindlich mit einer MHK kleiner oder gleich 0,06; resistent ab einer MHK größer 0,06). Weitere Studien müssen zeigen, ob in diesem Rahmen auch resistente Stämme detektiert werden können, oder ob für diese Gram-negative Stäbchenbakterien bei Ciprofloxacin andere Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Zusammengefasst ergibt sich somit für Ciprofloxacin eine Sensitivität von 96 % und eine Spezifität von 100 %.

3.2.3. Piperacillin/Tazobactam

Die Substanz mit der größten Abweichung der Ergebnisse im MBT-ASTRA vom MHK-Teststreifen war die Kombination aus β -Laktam-Antibiotikum und β -Laktamase-Inhibitor Piperacillin/Tazobactam.

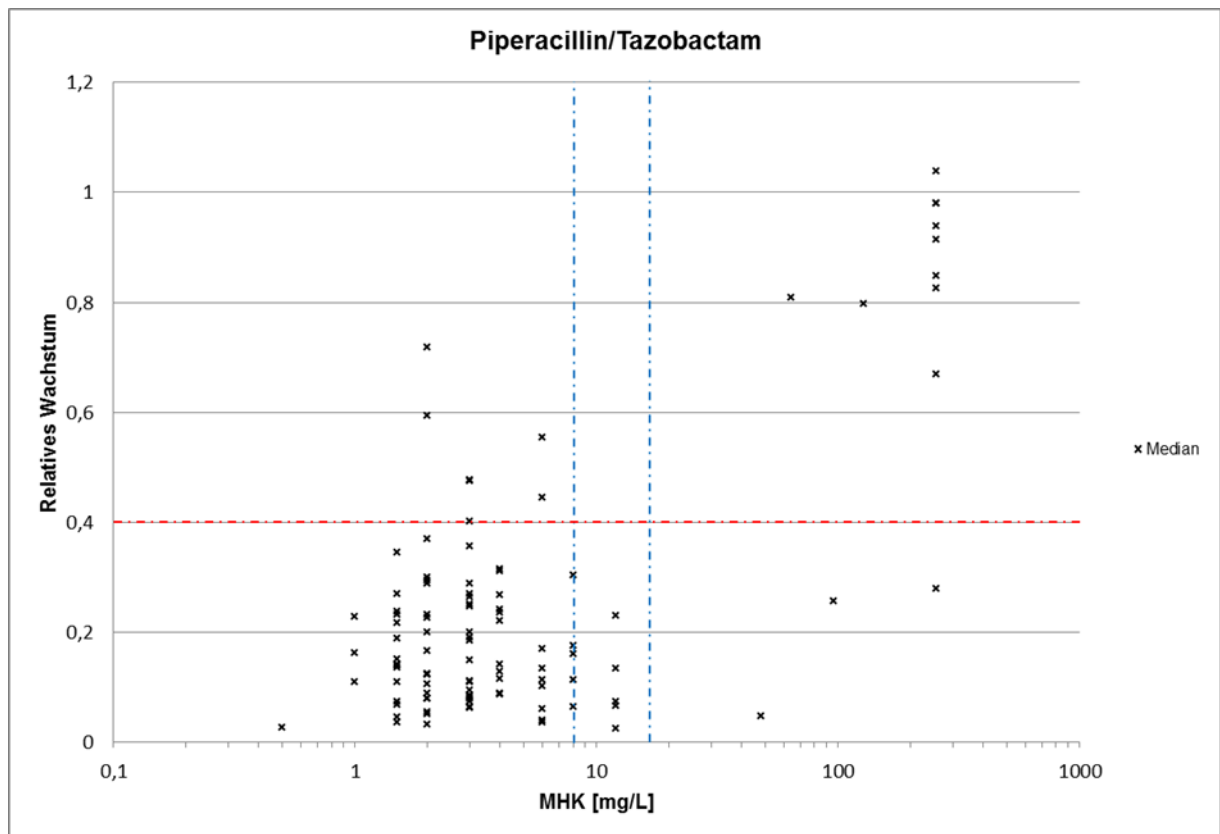


Abb. 9. Analyse der Resistenzlage von 104 Blutkulturen septischer Patienten für Piperacillin/Tazobactam. Die Werte des MHK-Teststreifens (X-Achse) sind für jeden Stamm gegenüber dem Median der Werte für das relative Wachstum aus der MBT-ASTRA-Prototypsoftware (Y-Achse) aufgetragen. Die rote gestrichelte Linie bei 0,4 markiert den Grenzwert, der im MBT-ASTRA-Test resistente von empfindlichen Erregern unterscheidet. Die blauen Geraden zeigen die zwei EUCAST-Grenzwerte an: bei einer MHK kleiner oder gleich 8 mg/L handelt es sich um ein empfindliches, ab einer MHK von größer 16 mg/L um ein resistentes Isolat. Liegt der Wert dazwischen, wird es als intermediär klassifiziert. Außer bei sieben empfindlichen und drei resistenten Stämmen, gelang eine übereinstimmende Zuordnung mit der konventionellen Resistenztestung. Fünf intermediäre Stämme wurden als empfindlich eingestuft.

Der Screening-Breakpoint erlaubt eine Kategorisierung in resistent (MHK liegt oberhalb der eingesetzten Breakpoint-Konzentration) und empfindlich (MHK liegt darunter). In einem zweiten Schritt erfolgte der Abgleich mit der konventionellen Resistenztestung und der Auswertung nach EUCAST. Mit der Wahl des MBT-ASTRA-Grenzwertes bei 16 mg/L, also dem EUCAST-Grenzwert für Resistenz, fallen auch die nach EUCAST-Bestimmungen intermediären Isolate unter die empfindliche Kategorie. Schließlich liegt deren MHK unterhalb der als Breakpoint eingesetzten Kon-

zentration. Es waren fünf solcher Stämme unter der Stichprobe (MHK = 12 mg/L), die alle unter den applizierten Bedingungen erwartungsgemäß als empfindlich eingestuft wurden. Bei einer wiederholten Testung besagter Stämme aus der Subkultur konnte jedoch auch durch Einsetzen des Antibiotikums entsprechend des empfindlichen EUCAST-Grenzwertes (MHK = 8 mg/L) kein anderes Ergebnis erzielt werden.

Außerdem erfolgte anhand des neuen Tests in sieben Fällen eine Klassifizierung als resistent, obwohl diese Isolate laut MHK-Teststreifen für die Substanz empfindlich waren. Genauer gesagt lag bei einem dieser Isolate der RG-Wert mit gerundet 0,403 genau auf der Grenze. In den meisten Fällen wäre hierbei bei einer händischen Auswertung der Spektren die Entscheidung anders getroffen worden, bzw. wären Ausreißer unter den Messungen, die das Ergebnis verfälschen können, erkannt und aussortiert worden. Die automatisierte Auswertung als mögliche Fehlerquelle wird in nachfolgendem Kapitel und in der Diskussion adressiert.

Bei drei eigentlich resistenten Proben kam im neuen Testverfahren die Zuordnung empfindlich heraus. Auch bei der händischen Betrachtung der Spektren war für die ermittelte MHK kein ausreichendes Wachstum zu verzeichnen.

Alle diese zehn Isolate konnten dann aber bei nochmaliger Testung aus dem System „Übernachtskultur auf Blutagar“ korrekt klassifiziert werden.

Abzüglich der intermediären Isolate wurden also für Piperacillin/Tazobactam eine Sensitivität von 77 % und eine Spezifität von 92 % erzielt.

3.3. Variabilität des internen Standards

Damit das Messsignal eine statistisch abgesicherte Gewichtung erhält, wurden die Proben in Quadruplikaten auf den Probenträger aufgetragen und gemessen. Kommt es (z.B. durch unregelmäßige Kristallisation der Matrix) zu Schwankungen in der Spektren-Intensität, spiegelt sich dies in der Streuung im Box-Plot-Diagramm wider. Die Software kann Ausreißer unter den Messungen (z.B. durch Verunreinigung des Probenträgers oder durch Fehler innerhalb des Messgerätes) nicht erkennen und nicht vor der Berechnung aussortieren. Besonders große Streuung im Box-Plot-Diagramm sollte folglich eine gesonderte Begutachtung entsprechender Rohspektren nach sich ziehen, um falsch-resistente und falsch-empfindliche Zuordnungen zu vermeiden (Vgl. auch „Kontrolle“ im Box-Plot-Diagramm von Abbildung 11).

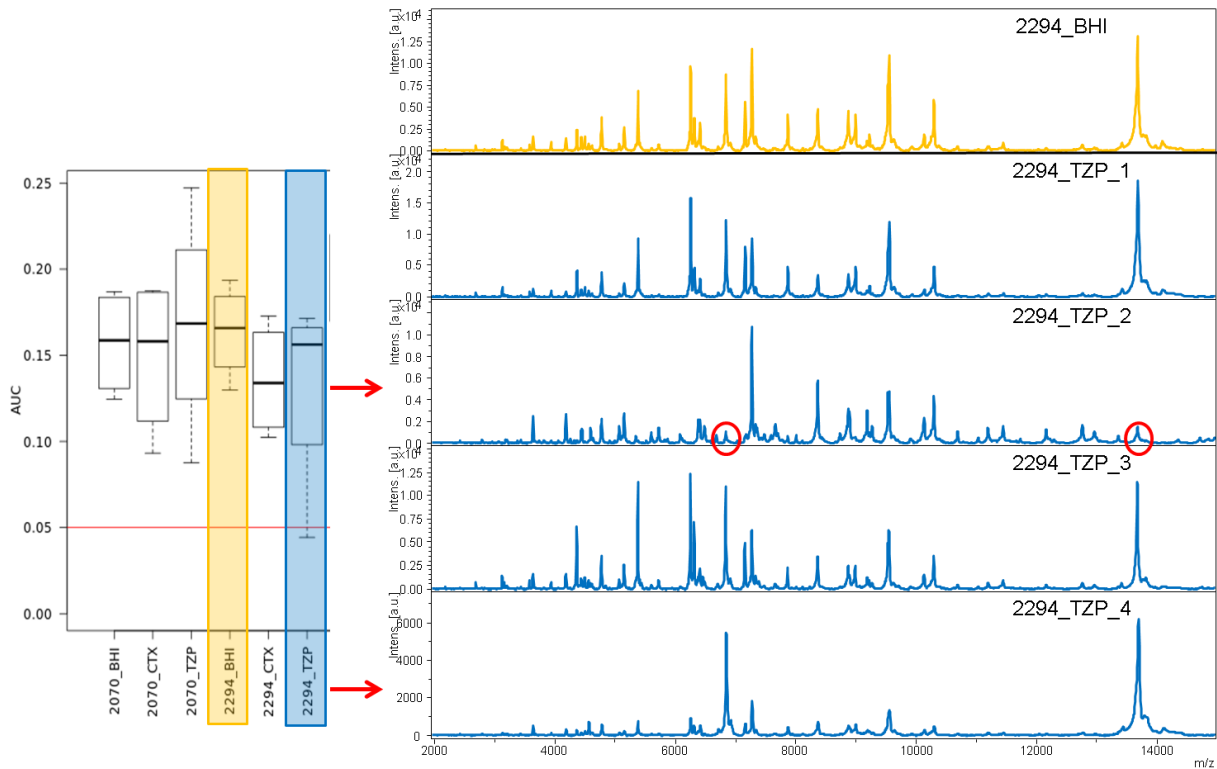


Abb. 10. Gegenüberstellung eines Box-Plot-Diagramms mit großer Streuung und der entsprechenden Rohspektren. **Ockerfarben:** das Spektrum der Wachstumskontrolle als Bezugsgröße. **Blau:** die vier Messungen des Ansatzes mit Piperacillin/Tazobactam des eigentlich empfindlichen Isolats (in der automatisierten Auswertung als resistent eingestuft). **Zwei Auffälligkeiten:** in der zweiten Messung (TZP_2) fehlen die zwei Standard-Peaks (rote Kreise). In der vierten Messung (TZP_4) ist insgesamt weniger bakterielles Protein detektiert worden (fast ausschließlich Standard-Peak).

Ab einer gewissen Konzentration bakterieller Proteine resultiert eine Zunahme der Proteinmenge nur unmerklich in einer Zunahme der Peakintensität. Dieses Erreichen eines „Sättigungswertes“ ist bereits in Kapitel 3.1. dargestellt. Was die Prototyp-Software jedoch nicht erfasst, ist die Variabilität der Peak-Intensität des internen Standards, die noch einer gewissen Dynamik zu unterliegen scheint (siehe Abbildung 11). In der Software scheint der Sättigungswert schon bei einer optischen Dichte von ca. 0,12 erreicht (vgl. Kapitel 3.1). Eine Verdoppelung der Zellzahl und somit der Proteinmenge kann von hier an nicht mehr diskriminiert werden. Die manuelle Auswertung durch Betrachtung der Spektren verkleinert diesen blinden Bereich. Mehr Protein bedeutet mehr Konkurrenz um Ionisation. Dies kommt in der Abnahme des internen Standards zum Ausdruck, welcher immer in einer festen, bekannten Konzentration allen Ansätzen hinzugegeben wird. Möglicherweise würde es eine Bereicherung darstellen, diese Tatsache in den Rechenalgorithmus der Software aufzunehmen. Es ist denkbar, dass die Sensitivität des Testes zur Diskrimination von Wachstumsunterschieden erhöht und v.a. „falsch-resistente“ Klassifikationen minimiert würden.

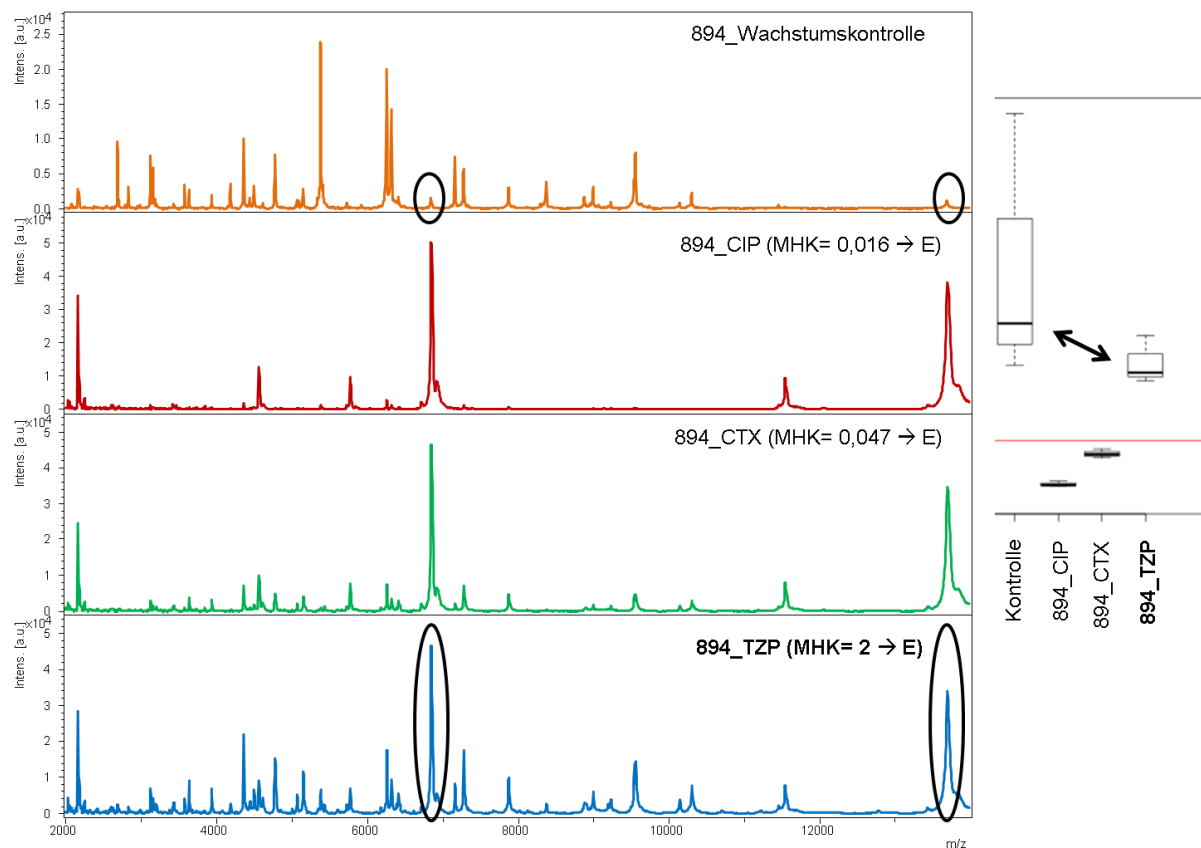


Abb. 11. Darstellung beider Auswertungsmöglichkeiten eines für Piperacillin/Tazobactam falsch-resistent getesteten Isolates. CIP= Ciprofloxacin, CTX= Cefotaxim, TZP= Piperacillin/Tazobactam. Das absolute Wachstum unter Einfluss von TZP wird von der Auswertungssoftware ungefähr auf Höhe der Wachstumskontrolle angesiedelt, was zum falsch-resistenten Phänotyp führte. Bei der manuellen Auswertung der tatsächlichen Spektren wäre die Entscheidung womöglich anders getroffen worden. Das Phänomen der Variabilität des Standards bei ansonsten schon gesättigter bakterieller Peakintensität konnte des Öfteren beobachtet werden.

3.4. Biologische und technische Replikate

Der Algorithmus zur Behandlung septischer Patienten sieht es vor, mehr als eine Blutkultur abzunehmen, um die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses zu erhöhen. Wenn es sich ergab, dass von demselben Patienten an einem Tag zwei Proben positiv wurden und zur Verfügung standen, wurden diese in parallelen Ansätzen zur Untersuchung der Inter-Assay-Varianz verarbeitet. Insgesamt wurden 14 Probenpaare getestet, was in nachstehender Abbildung veranschaulicht ist. Darunter waren acht Paare *Escherichia coli*, zwei *Klebsiella pneumoniae* und jeweils ein Paar *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Serratia marcescens*. Nur bei dem Kombinationspräparat Piperacillin/Tazobactam gab es bei

zwei von 14 Probenpaaren abweichende Ergebnisse (mit Ausrufezeichen markiert). Dabei handelte es sich jeweils um die aeroben Kulturflaschen zweier *E. coli* Stämme.

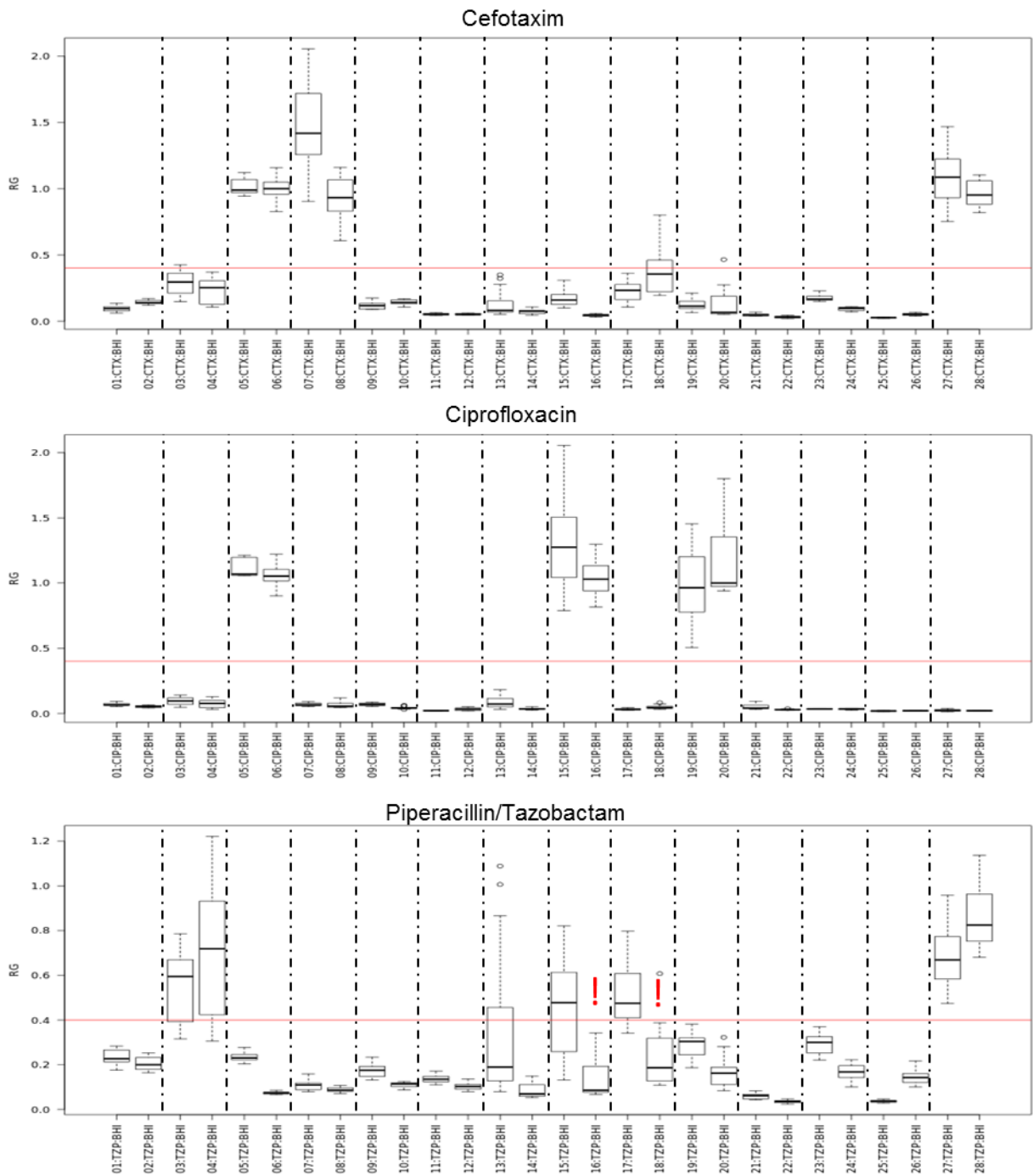


Abb. 12. Inter-Assay-Varianz von 14 Probenpaaren. Die zusammengehörigen Proben sind für jede Substanz nebeneinander im Modus des relativen Wachstums dargestellt (Grenzen durch gestrichelte Linien). In lediglich zwei Fällen kam es zu abweichenden Messungen (rotes Ausrufezeichen).

Bei vier zusätzlichen Proben wurde anderes Material als Blut untersucht (drei Ascites und ein Biliom; drei *Escherichia coli* und eine *Klebsiella pneumoniae*), da dieses

ebenfalls in Blutkulturflaschen eingesandt worden war. Auch hierbei gelang eine fehlerfreie Zuordnung entsprechend der Ergebnisse mittels MHK-Teststreifen.

3.5. Vergleich aerobe und anaerobe Kulturbedingungen

Durch das unterschiedliche Probenaufkommen wurden in der Studie sowohl aerobe, als auch anaerobe Blutkulturflaschen bearbeitet, wobei mit einer Verteilung von ungefähr 60% zu 40% mehr aerobe Proben eingeschlossen wurden. Bei den Ergebnissen im MBT-ASTRA Test konnte kein deutlicher Unterschied gefunden werden, ob die Isolate zuvor in aeroben oder anaeroben Kulturbedingungen bebrütet worden waren.

Bei der Testung der Inter-Assay-Variabilität gab es zwei falsch resistente Zuordnungen aus aeroben Flaschen, wobei jeweils das entsprechende anaerobe Gegenstück das richtige Ergebnis erbrachte (vgl. Abb. 12). In der manuellen Auswertung wäre die Entscheidung im direkten Vergleich aller Spektren unter Umständen anders getroffen worden. Wie bereits unter 3.1 und 3.3 erwähnt, können Ausreißer in Form von fehlerhaften Messungen an der Andersartigkeit der Spektren erkannt und aussortiert werden. Diese Wertestreuung wird auch in den resultierenden Minima und Maxima widerspiegelt. Zum anderen können die Datensätze differenzierter analysiert werden, als das mit einem Rechenalgorithmus möglich ist. Vorstellbar ist auch, dass das Wachstum aus vorangegangenen anaeroben Kulturbedingungen durch Verlängerung der Lag-Phase durch die Umstellung zögerlicher anläuft und somit der Unterschied deutlicher hervortritt.

3.6. Verkürzung der nötigen Inkubationszeit

Der wesentliche Vorteil der hier vorgestellten MBT-ASTRA Methode liegt in der schnelleren Verfügbarkeit der Resistenzlage der untersuchten Isolate begründet. So können laufende Antibiotikatherapien bei kritisch kranken Patienten schneller angepasst und wertvolle Stunden gewonnen werden. Da eine größere Zeitersparnis bis zum Erhalt der Ergebnisse noch attraktiver ist, wurden Versuche zur Verkürzung der Inkubationszeit angeschlossen.

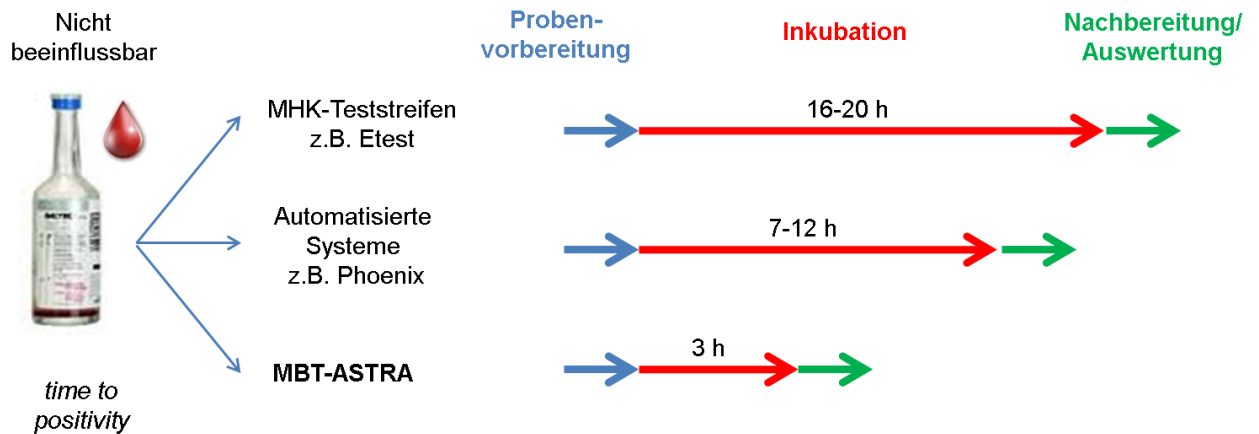


Abb. 13. Zeitgewinn durch die MBT-ASTRA Methode. Die MBT-ASTRA Methode erlaubt eine schnellere Aussage zur Resistenzlage pathogener Bakterien. Der größte Anteil der Zeitersparnis ist durch die Verkürzung der Inkubationszeit möglich, da massenspektrometrisch im Vergleich zu herkömmlichen Methoden bereits kleinere Wachstumsunterschiede messbar werden.

Die Versuchsbedingungen wurden wie gehabt belassen, nur die Zeit auf 2,5 Stunden verkürzt für die Antibiotika Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam. Da sich für Ciprofloxacin wegen der Deutlichkeit der Ergebnisse herauskristallisierte, dass die Wirkung schneller eintreten muss als bei den anderen beiden Substanzen, wurde hierfür die Inkubationszeit auf 90 Minuten halbiert. Die einzusetzende optische Dichte wurde auf 0,05 erhöht, um auch in dieser kurzen Zeit bei empfindlichen Stämmen einen ausreichend deutlichen Wachstumsunterschied im Kontrollansatz detektieren zu können. 15 Blutkulturen mit Gram-negativen Erregern wurden in diesem Teilprojekt untersucht. Darunter waren elf *Escherichia coli*, zwei *Klebsiella pneumoniae*, ein *Enterobacter cloacae* und ein *Pseudomonas aeruginosa*.

Für Cefotaxim erfolgte bei allen Proben die Zuordnung in Übereinstimmung mit dem MHK-Teststreifen.

Bei Ciprofloxacin wiesen zwei der Isolate eine MHK knapp unterhalb des Grenzwertes (0,25 mg/L und 0,38 mg/L) auf und wurden im MBT-ASTRA Test unter den Bedingungen für die kürzere Inkubationszeit als resistent klassifiziert. Eine nochmalige Testung mit einer Inkubationszeit von drei Stunden erbrachte dann aber das richtige Resultat.

Die Substanz Piperacillin/Tazobactam lieferte auch in diesem Fall die meisten inkorrekten Ergebnisse. Ein *Escherichia coli* (MHK= 32 mg/L) und eine Extended-Spectrum Betalaktamase (ESBL) bildende *Klebsiella pneumoniae* (MHK= 24 mg/L) zeigten sich im neuen Verfahren empfindlich.

Ein im MHK-Test empfindlicher *Pseudomonas aeruginosa* und ein *Escherichia coli* wiederum wurden als intermediär bzw. resistent klassifiziert. Auch nach erneuter Testung aus der Subkultur und nach drei-stündiger Inkubation konnte keine Übereinstimmung erzielt werden. Ein Stamm erbrachte bei mehrmaliger Messung inkonstante Ergebnisse.

Die „falsch empfindliche“ *Klebsiella pneumoniae* konnte im anschließenden Microarray als ESBL-Bildner identifiziert werden. Sie wurde daraufhin ebenfalls mit dem Automaten „Phoenix“ (BD, Heidelberg, Deutschland) untersucht, und wurde in diesem System mit einer MHK von 16 mg/L als intermediär gewertet. Dieser Sonderfall bereitete also auch den bewährten Geräten der Routinediagnostik Schwierigkeiten. Beim *Escherichia coli* mit einer MHK nur eine Titerstufe über dem Grenzwert, handelt es sich nicht um ein hoch-resistentes Isolat. Mittels Microarray konnte keiner der im Test enthaltenen Resistenzgene bzw. –engruppen nachgewiesen werden (KPC, NDM, ESBL, AmpC, AmpC-Gen, CTX-M Gruppe, SHV SNP, TEM SNP). Es könnte sich hierbei um einen unspezifischen Porindefekt oder eine verstärkte Aktivität einer Exportpumpe handeln, welche für die „knappe“ oder Pseudoresistenz verantwortlich sind, anstelle eines echten Resistenzmechanismus. Das Aktivitätsniveau solcher Porine und Pumpen lässt sich genotypisch nie beurteilen und könnte im applizierten Rahmen des MBT-ASTRA Testes zum beobachteten empfindlichen Phänotyp führen.

Der „falsch resistente“ *Escherichia coli* ergab auch im in der Routinediagnostik verwendeten halbautomatisierten Mikrodilutionsverfahren eine MHK von 4 mg/L, also einen empfindlichen Phänotyp. Es handelte sich aber um ein ESBL-Isolat. Bei ESBL-Bildnern kann es vorkommen, dass eine gewisse Enzymaktivität vorhanden ist, die mit den Referenzmethoden nicht nachgewiesen werden kann.

Die Versuchskombination aus *Pseudomonas aeruginosa* als Erreger und Piperacillin/Tazobactam als Substanz bereitete im Allgemeinen einige Schwierigkeiten, was im Diskussionsteil detaillierter dargestellt ist.

In weiteren Versuchen von der Subkultur konnten Hinweise gesammelt werden, wie eine richtige Diskrimination vielleicht doch in kürzerer Zeit möglich ist. Die ermittelten Parameter für die einzelnen Substanzen sind wie folgt:

Bei kürzerer Inkubationszeit ist eine etwas höhere Bakteriendichte zu Beginn nötig, um ein Spektrum von ausreichender Intensität zu erhalten. Unter Zugabe von Cefotaxim schien hierbei die vierfache Antibiotika-Menge nötig zu sein, um die kor-

rekte Diskrimination von empfindlichen und resistenten Stämmen zu erlangen. Dies war dafür schon nach zwei Stunden möglich ($OD_{600nm} = \text{ca. } 0,0035$, exemplarisch an einem *Enterobacter cloacae*, zwei *Escherichia coli*, einer *Klebsiella pneumoniae* getestet).

Für Ciprofloxacin konnte bei einer geringeren zu Beginn eingestellten optischen Dichte von 0,025 nach nur 1,5 stündiger Inkubation auch bei den zwei obigen „falsch resistenten“ Isolaten unter Einsatz der zehnfachen Breakpoint-Konzentration das korrekte Ergebnis erzielt werden. Diese beiden Stämme hatten MHKs nur knapp unterhalb des Grenzwertes aufgewiesen. Bei Einsatz einer höheren Bakteriendichte scheint eine Art „Inokulum-Effekt“ aufzutreten. Für *Pseudomonas* reichte bereits die vierfache Konzentration aus bei einer OD von 0,07. Wurde die OD= 0,035 eingepflegt, reichte sogar die einfache Menge aus. Dies wurde beispielhaft an Reinkulturen von einem *Enterobacter cloacae*, zwei *Escherichia coli*, zwei *Klebsiella pneumoniae* und zwei *Pseudomonas aeruginosa* bekannter MHKs getestet. Nachdem die meisten Unstimmigkeiten in diesem Test bei Stämmen auftreten, deren MHK nahe der Grenzwerte liegen, müsste dies allerdings zunächst bei zusätzlichen solchen „Spezialfällen“ evaluiert und vor allem die Übertragbarkeit auf das eigentliche Testsystem, nämlich Blutkulturen, überprüft werden.

Bei Piperacillin/Tazobactam (ein *Enterobacter cloacae*, ein *Escherichia coli*, eine *Klebsiella pneumoniae*, ein *Pseudomonas aeruginosa*) schien es für die empfindlichen Erreger keinen Unterschied zu machen, ob die ein- oder vierfache Breakpointkonzentration eingesetzt wurde, für resistente Stämme konnte ein Unterschied gesehen werden. Hier scheint der ausschlaggebende Faktor zu sein, eine möglichst geringe Ausgangsmenge zu haben (ausgehend von der Agarplatte ca. $OD = 0,002$), bei dann nur einfacher Antibiotikakonzentration. Bei der Testreihe mit Reinkulturen von der Agarplatte konnten nach 2,5 Stunden eine deutlichere Auftrennung erzielt werden, als nach zwei Stunden. Eine um mindestens eine Generationszeit kürzere, zweistündige Inkubationszeit erscheint denkbar, allerdings müsste der Cut-off möglicherweise angepasst werden, da Piperacillin/Tazobactam nicht so schnell zu wirken scheint, wie beispielsweise Ciprofloxacin. Es ist die Brücke zu schlagen zwischen ausreichend Ausgangsmaterial für ein aussagekräftiges Wachstum, aber auch gering genug, um keine „falsch resistente“ Zuordnung zu erzielen. Ein größerer Unterschied im Wachstum und somit einen deutlicheren Abstand des RG-Wertes vom Cut-off, erhält man bei geringerer Einsaat, allerdings zu Lasten der Inkubationszeit.

4. Diskussion

4.1. Stellenwert der in vitro Testung

In vitro Tests stellen immer nur eine Annäherung an die Wirklichkeit dar. Bei allen Verfahren gilt es zu beachten, dass während der Testung der MHK künstliche Versuchsbedingungen herrschen, die oft weit von den tatsächlichen in vivo Bedingungen abweichen. So liegt z.B. ein neutraler pH vor, wohingegen Entzündungsherde meist einen sauren pH aufweisen, ebenso können die Elektrolyt- und Nährstoffkonzentrationen schwanken, sowie das Sauerstoffangebot und die Keimdichte. Kontinuierliche Antibiotikakonzentrationen über 24 Stunden sind in einem lebenden Organismus schwer sicherzustellen, manchmal sogar nicht erwünscht, je nach Wirkweise der eingesetzten Substanz ¹.

Die Höhe der experimentell ermittelten MHK eines Isolates spiegelt der Form nach dessen Empfindlichkeit wieder. Durch anschließenden Abgleich mit den klinischen Grenzwerten erfolgt die Klassifikation in empfindlich, intermediär oder resistent und somit korreliert sie auch mit dem therapeutischen Erfolg.

Diese Breakpoints werden z.B. durch die EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) bestimmt. Sie ist ein Komitee, das sich die Vereinheitlichung der klinischen Grenzwerte in Europa zum Ziel gesetzt hat und deren Richtlinien den Arbeitsanweisungen in unserem Labor zu Grunde liegen. Für neue Substanzen werden Breakpoints definiert und bestehende laufend überprüft und überarbeitet. In diesen Prozess fließen die Parameter Resistenzmechanismen, Dosierung, Pharmakokinetik und –dynamik, MHK-Verteilungen und epidemiologische Cut-Off Werte mit ein. Letztere basieren auf epidemiologische Erhebungen der MHK-Werte von Wildtypstämmen, d.h. ohne erworbene Resistenzmechanismen ⁵⁹. Neben der EUCAST gibt es als amerikanisches Pendant die Institution CLSI (the Clinical and Laboratory Standards Institute) und außerdem einige Gremien auf nationaler Ebene, die sich mit diesen Fragestellungen und der Umsetzung beschäftigen.

Bezüglich der Pharmakokinetik/Pharmakodynamik (PK/PD) von Antibiotika gibt es unterschiedliche Konzepte, die für die tatsächliche antimikrobielle Wirkung essentiell sind. Die Pharmakodynamik beschreibt die Art der Arzneimittelwirkung im Körper. Pharmakokinetik hingegen den Einfluss, den der Organismus selbst auf die potentielle Maximalwirkung eines Arzneimittels ausübt. Eckpunkte sind hierbei z.B. die Re-

sorption im Darm, der biochemische Um- und Abbau und die Ausscheidung des Stoffes. Wenn eine antibiotische Substanz zeitabhängig die beste Wirkung entfaltet, hat das unmittelbare Konsequenzen für die Patientenversorgung. So sollte der Substanzspiegel z.B. über die Infusionsdauer möglichst lang auf einem Level gehalten werden, um so effektiv wie möglich zu behandeln. Wohingegen bei konzentrationsabhängiger Wirkung in der Therapie hohe Spitzenspiegel angestrebt werden sollten⁶⁰. Dabei dürfen die verabreichten Konzentrationen für den Patienten nicht toxisch sein. Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Reduktion der bakteriellen Last mit weitaus geringeren Konzentrationen möglich ist, als benötigt wird, um das Entstehen oder die Expansion resistenter Subpopulationen zu verhindern⁶¹. Im Hinblick auf die sich häufenden Resistenzentwicklungen könnte das strengere Einhalten von Wirkspiegeln an Bedeutung gewinnen.

Es ist nicht nur die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Bedingungen zu bedenken und zu prüfen, auch können unterschiedliche Testrahmen unterschiedliche Auswirkungen haben. Beispielsweise ist denkbar, dass die Erreger ein anderes Verhalten bezüglich der Lag-Phase an den Tag legen, abhängig davon, ob sie von Flüssig- oder Festmedium in die Testbedingungen eingebracht werden. Dies kann sich auf die benötigte *time-to-result* auswirken. Auch könnte die Enzymausstattung der Bakterien nach Anzucht auf optimalem Festmedium besser sein. In dieser Studie fand eine Überführung vom flüssigen Kulturmedium der Blutkulturflaschen in flüssiges Medium zur Empfindlichkeitstestung statt.

4.2. Optimierung der Testprotokolle für den Einsatz bei Blutkulturen

Aufbauend auf der Veröffentlichung von Lange et al. wurde der dort beschriebene MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA) für die Anwendung an echten Patientenproben optimiert⁵². Folgende Modifikationen des dort veröffentlichten Protokolls erwiesen sich für den Transfer in die klinische Situation als notwendig.

Zunächst fiel auf, dass in dem eingesetzten Volumen zu Beginn schon zu viele bakterielle Zellen enthalten waren, was dazu führte, dass immer das Resultat „resistent“ ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.1. „linearer Bereich“). Auch die Reduktion der eingesetzten Menge schien wenig zielführend, da es keine Möglichkeit gab, die anfängli-

che Erregerkonzentration zu bestimmen und zu dokumentieren, zumal dies von Probe zu Probe variieren kann. Croxatto et al. beschreiben, dass bei starkem Wachstum in einer positiven Blutkultur bis zu 10^6 - 10^8 KBE/mL Flüssigkeit zu finden sind ²⁰. Auch in unserer eigenen Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer anderen Studie festgestellt, dass die bakteriellen Pellets, die aus der Zentrifugation von einem mL Blutkulturflüssigkeit gewonnen werden, zwischen 10^7 - 10^9 Zellen enthalten können ³⁸. Nicht zuletzt kann, ohne 24-stündige Besetzung, im diagnostischen Routinebetrieb die sofortige Probenbearbeitung nicht zu jedem Zeitpunkt gewährleistet werden. Im Fall, dass eine Blutkultur nachts positiv wird, treten bis zur ihrer Weiterverarbeitung noch etliche Zellteilungen auf. Es fällt also schwer anzunehmen, dass in einem bestimmten Volumen immer die gleiche Menge koloniebildender Einheiten enthalten ist. Aus diesem Grund wurde dazu übergegangen, die Krankheitserreger schon zu Beginn der Verarbeitung zu isolieren und aufzureinigen, womit dann eine bestimmte optische Dichte eingestellt und eine konstante, genaue und reproduzierbare Ausgangssituation geschaffen wird. So könnte in Zukunft auch eine positive Probe aus der Nacht am nächsten Morgen unter den gleichen, genormten Bedingungen dem Test zugeführt werden, und es kann sichergestellt werden, dass man sich im linearen Bereich für die Wachstumsdetektion befindet.

Außerdem werden unversehrte, vitale bakterielle Zellen benötigt, da die Inkubation und der eigentliche Test noch bevorstehen. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde eine schonendere Aufreinigung über ein Serumröhrchen mit Trenngel gewählt ⁴¹, da die Extraktion der Krankheitserreger auch besser gelang, als mit dem von Lange et al. verwendeten Lysepuffer. Dass das Detergens neben den menschlichen Zellen in der Blutkulturflüssigkeit, nicht auch die bakterielle Zellmembran beeinflusst, konnte nicht ausgeschlossen werden.

Um auch mit dem neuen Test den Anforderungen der EUCAST gerecht zu werden, wurde außerdem in diesem Zusammenhang auf das „AST-Medium“ des BD Phoenix Systems als Kulturmedium gewechselt. Dieses flüssige Mueller-Hinton Medium entspricht dem ISO Standard 20776-1, 2006. Für die Bouillonverdünnungs-Methode wird Mueller-Hinton-Flüssigmedium, das mit Kationen versetzt ist, international am häufigsten eingesetzt ¹². Das BHI-Medium wurde des weiteren als zu stark und zu dunkel gefärbt empfunden, um mit dem bloßen Auge eine Zelldichte von 0,5 des Mc-Fahrland-Trübungsstandards einzustellen, wie von Lange et al. an anderer Stelle

vorgeschlagen. Auch zur Einstellung der objektiveren optischen Dichte mittels Photometer eignet sich das AST-Medium besser.

Durch Titrationsversuche (vgl. Kapitel 3.1.) wurde diejenige optische Dichte ermittelt, die optimale Ergebnisse liefert. Wir entschieden uns deshalb für eine geringere Ausgangskonzentration mit einer längeren Inkubationszeit zugunsten eindeutigerer Ergebnisse, da aufgrund flacher verlaufender Killing-curves anzunehmen war, dass nicht alle antibiotischen Substanzen ihre Wirkung so schnell und absolut entfalten, wie Meropenem. Außerdem brauchen Bakterien bei einem Medium-Wechsel etwas Zeit, bis das Wachstum in die exponentielle Phase eingeht. Es wurden 3 Stunden für die erste Versuchsphase festgelegt.

Zur besseren Handhabung wurden die abschließenden Schritte der Proteinextraktion auf eine Filterplatte verlagert. Da es sich um einen semi-quantitativen Ansatz handelt, sind viele Waschschrte in Eppendorf-Gefäßen abträglich und würden das Resultat verfälschen. Es kann nicht gewährleistet werden, dass keine oder wie viele Zellen in den verschiedenen Ansätzen und Waschschrten verloren gehen. Dieses Problem wurde gelöst, indem die bakteriellen Zellen jedes Ansatzes separat nach Ablauf der Inkubationszeit auf der Membran eines Wells einer Filterplatte aufgefangen wurden. Auf diese Weise konnte gewaschen und das Filtrat verworfen werden, ohne Zellen zu verlieren. Das Lysat mit den Proteinen für die massenspektrometrische Analyse wurde anschließend in einer neuen, sterilen Mikrotiterplatte aufgefangen.

4.3. Mögliche Erklärungen für die Missklassifikationen

Mit dem neuen Test konnte substanzübergreifend eine Sensitivität von 92 % und eine Spezifität von 97 % erzielt werden. Dies wurde, wie bereits unter Kapitel 3.2. erörtert, ohne die intermediären Isolate berechnet. Diese wurden im applizierten Testrahmen richtiger Weise als empfindlich eingestuft, werden im klinischen Setting aber natürlich nicht mit entsprechendem Antibiotikum therapiert. Auf mögliche Erklärungen für die aufgetretenen Abweichungen soll an dieser Stelle eingegangen werden.

Fünf Isolate brachten auch bei der Nachtestung aus der Subkultur erneut das falsche Resultat. Diese wenigen Missklassifikationen lassen vermuten, dass die neue Methode zur schnelleren Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS weder hinsichtlich

der aufgetretenen Bakterienarten noch der Blutkulturbedingungen (aerob/anaerob) Einschränkungen aufweist.

4.3.1. Testaufbau

Der eingesetzte Screening-Grenzwert erlaubte die Differenzierung zwischen phänotypisch empfindlichen und resistenten Isolaten. Stämme mit einer minimalen Hemmkonzentration kleiner der eingesetzten Antibiotikakonzentration zeigten erwartungsgemäß kein Wachstum, diejenigen mit einer höheren MHK hingegen schon. Erreger, die anhand der EUCAST Klassifikation als intermediär eingestuft würden, können mit dem applizierten Testaufbau per se nicht als solche kategorisiert werden.

Für die Wahl der „MBT-ASTRA Breakpoint Konzentration“ orientierten wir uns an den EUCAST Grenzwerten. Dies hatte den Hintergrund, dass wir vorzogen, dieselbe Konzentration bei allen im Studienzeitraum auftretenden Erreger anzuwenden. Zum einen im Hinblick auf die angestrebte Routinetauglichkeit, zum anderen, weil alle Blutkulturen mit Gram-negativen Stäbchen eingeschlossen werden sollten. Das Gros der Krankheitserreger machen Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae* aus, aber auch *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter sp.* sind vor allem bei nosokomialen Infektionen zu finden. Isolate dieser beiden Spezies weisen oft viele, zum Teil kombinierte Resistenzmechanismen auf.

Als Beispiel soll das Kombinationspräparat Piperacillin/Tazobactam dienen. Für *Acinetobacter sp.* existieren keine klinischen Grenzwerte für Penicilline. *Enterobacteriaceae* werden entsprechend der EUCAST Kriterien mit einer MHK kleiner oder gleich 8 mg/L als empfindlich, mit einer MHK größer 16 mg/L als resistent eingestuft. Liegt der gemessene MHK-Wert dazwischen fallen sie unter die intermediäre Kategorie. Bei *Pseudomonas aeruginosa* entfällt diese allerdings. Es gibt genau einen Grenzwert. Isolate mit MHKs kleiner oder gleich 16 mg/L gelten als empfindlich, ist sie größer als 16 mg/L sind sie resistent. Deshalb wählten wir als Screening Breakpoint die höhere Konzentration, also den EUCAST Grenzwert für Resistenz für *Enterobacteriaceae*, da sie auf alle Gram-negative Erreger angewendet werden kann, sofern sie einer Therapie mit der getesteten Substanz zugänglich sind. Konnte ein signifikantes Wachstum verzeichnet werden, lag die minimale Hemmkonzentration (also ab einer MHK von 24 mg/L) jenseits des Grenzwertes und die Erreger waren gegen die getestete Substanz sicher resistent – ansonsten empfindlich,

was die nach EUCAST tatsächlich empfindliche und intermediäre Kategorie zusammenfasst.

Zwar bestand die Möglichkeit einer falsch resistenten Zuordnung von *Pseudomonas* sp. mit einer MHK von genau 16 mg/L, was allerdings den **minor Fehler** darstellt. Außerdem hatte sich in den Vorversuchen an Reinkulturen – wie unter Kapitel 3.1. bereits angedeutet – eher eine Tendenz zu „falsch resistenten“ Ergebnissen abgezeichnet. Ein Vielfaches der Breakpoint-Konzentration einzusetzen hätte den **major Fehler** der falsch empfindlichen Zuordnung begünstigt, v.a. bei niedrig resistenten Isolaten. Im Hinblick auf eine suffiziente Patientenversorgung muss ein Fehler dieser Art vermieden werden.

Zu dem hier vorgestellten, sehr neuen Verfahren zur schnellen Resistenzbestimmung existieren bislang nur sehr wenige Daten. So ist dies die erste Studie mit klinischen Proben. In dieser Studie war es daher von besonderem Interesse, wie sich Isolate mit MHK-Werten nahe des klinischen Grenzwertes für Resistenz verhalten. Auch aus diesem Grund schien es nicht zielführend, ein Vielfaches des Grenzwertes als Breakpoint-Konzentration einzusetzen.

Wie dargelegt, wurden unter den applizierten Bedingungen die nach EUCAST intermediären Stämme erwartungsgemäß als empfindlich eingestuft. Erstaunlicher Weise konnten sie jedoch auch in der Nachtestung durch Einsatz des empfindlichen EUCAST-Grenzwertes (also 8 mg/L), nicht als „resistente“ Isolate erkannt werden. Allerdings gelang hierbei eine richtige Einordnung der beiden Stämme, die in Kapitel 3.5. für die Substanz Piperacillin/Tazobactam auch in der Nachtestung falsch empfindlich waren. Es handelte sich um einen *Escherichia coli* und eine *Klebsiella pneumoniae*, die mit ihren MHKs nur knapp im resistenten Bereich lagen. Für diese Fälle also scheint es eine Verbesserung der Sensitivität des Testes zu bedeuten, die antibiotischen Substanzen entsprechend des empfindlichen EUCAST Grenzwertes einzusetzen. In nachfolgenden Studien müsste getestet werden, ob der Einsatz von Konzentrationen sogar unterhalb des empfindlichen Grenzwertes eine scharfe Trennung zwischen nach EUCAST-Kriterien empfindlichen und intermediären Erregern möglich macht. Denkbar wäre, dass sich dann die falsch resistenten Zuordnungen häufen. Sicherlich ist es von großem Wert, durch weitere Optimierung der Parameter alle intermediären Stämme in diesem Test als „resistent“ einzustufen.

Ein weiterer Lösungsansatz wäre, mehr als eine Konzentration gleichzeitig zu testen, was einen automatisierten, bzw. Geräte-unterstützten Arbeitsablauf z.B. mittels Mikrotiter-Platten und Pipettier-Robotern voraussetzt, um nicht zu einem größeren Zeitverzug bis zum Vorliegen der Resultate zu führen. Wie in Kapitel 3.6. angedeutet, erscheint es ebenso plausibel, dass sich die optimalen Versuchsbedingungen für verschiedene Erreger-Substanz-Kombinationen unterscheiden. Eine Erklärung hierfür könnte z.B. in der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Bakteriengattungen oder den Wirkmechanismen der Antibiotikaklassen begründet liegen. Die ungleichen Resistenzlagen spiegeln sich auch schon in den EUCAST-Grenzwerten wider. Mit aufwändigeren, individualisierten Testsettings könnte man diesen Unterschieden zwischen *Enterobacteriaceae* und Nonfermentern –wie oben beschrieben – besser gerecht werden, allerdings wiederum zu Lasten der Zeit. Dann müsste eine Erreger-Identifikation der Resistenztestung zwingend vorausgehen, um die passenden Versuchsparameter zu wählen.

Sollte sich in aufbauenden Studien zeigen lassen, dass der MHK-Wert der konventionellen Testung mit dem RG-Wert des MBT-ASTRA korreliert, ließe sich analog der EUCAST-Grenzwerte ein intermediäres RG-Intervall definieren. Ob eine Korrelation besteht, könnte in großem Maße von den applizierten Rahmenbedingungen abhängen. So scheint z.B. die Antibiotika-spezifische *time-kill*-Kurve für die Deutlichkeit der Ergebnisse bei dieser kurzen Inkubationszeit eine maßgebliche Rolle zu spielen.

Sparbier et al. evaluierten den MBT-ASTRA Ansatz in einer *proof-of-concept*-Studie an Übernachtskulturen auf Festmedium. Dabei wurden verschiedene Gram-negative Bakterienspezies und Antibiotika-Klassen untersucht. Es zeigte sich, auch im Vergleich zur vorangegangenen Publikation dieser Arbeitsgruppe, Optimierungsbedarf für jede der untersuchten Kombinationen und es ergaben sich unterschiedliche Inkubationszeiten und Konzentrationen der jeweiligen antimikrobiellen Substanzen für die verschiedenen Krankheitserreger. Es wurde eine Keimdichte von 0,5 des McFarland-Trübungsstandards in Brain-Heart-Infusion Medium (BHI) eingestellt. Für dieses Setting erwies sich beispielsweise für *E. coli* bei zweistündiger Inkubation eine CTX-Konzentration von 20 µg/mL als notwendig, was der zehnfachen Breakpoint-Konzentration entspricht. Auch CIP wurde exemplarisch an *E. coli* untersucht mit einer Konzentration von 4 µg/mL (vierfach höhere Breakpoint-Konzentration) und drei Stunden Bebrütung. Für β -Laktame und Fluorchinolone konnte diese Arbeitsgruppe

keine direkte Korrelation zwischen dem RG-Wert und der MHK der Teststreifen erkennen⁵⁸. Allerdings beobachteten und beschrieben die Autoren für das Aminoglykosid Tobramycin in Titrationsversuchen eine „MBT-ASTRA MHK“, welche direkt mit der MHK der Isolate korrelierte.

Wie mehrfach beschrieben, stellt eine automatisierte Auswertungssoftware auch eine potentielle Fehlerquelle dar. Eine große Streuung der Werte im Box-Plot-Diagramm sollte zur Sichtung der Rohspektren anregen. So könnten beispielsweise unsaubere Messungen vom Rechenalgorithmus ausgenommen und falsch-positive, sowie falsch-negative Zuordnungen minimiert werden (vgl. hierzu Kapitel 3.1, sowie 3.3).

Dass die genaue Breakpoint-Findung auch für die konventionelle, kulturabhängige Resistenztestung Schwierigkeiten bereitet, insbesondere bei bestimmten Kombinationen von antibiotischer Substanz und bakterieller Gattung, zeigen auch die jüngst veröffentlichte EUCAST-Norm für 2019 und die damit verbundenen Änderungen⁶². Nicht nur wird mit „ATU“ als „*area of technical uncertainty*“ eine Kategorie erschwerter Interpretation eingeführt⁶³, auch der Begriff „intermediär“ wird neu definiert als „*susceptible, increased exposure*“. Es wird also ein therapeutischer Erfolg angenommen, bei einer erhöhten Substanzkonzentration am Infektionsort, und die intermediäre Kategorie wird somit eindeutig der empfindlichen zugeordnet.

4.3.2. Ciprofloxacin

Der spezielle Stellenwert von Ciprofloxacin bei der Spezies *Salmonella enterica* Serovar Typhi ist bereits im Ergebnisteil behandelt worden. Da in dem unselektionierten Kollektiv dieser Studie keine resistenten Stämme auftraten, müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob mit den hier dargestellten Parametern zuverlässig korrekte Klassifikationen möglich sind, trotz der von den übrigen *Enterobacteriaceae* abweichenden Grenzwerten.

Für diese Substanz gab es eine falsch-empfindliche Zuordnung eines im MHK-Test (MHK= 2 mg/L) nur knapp resistenten *Pseudomonas aeruginosa*, wobei der Median des relativen Wachstums mit 0,37 knapp an der Grenze lag. Wenn das Fenster des Spektrums, das zur Berechnung der Werte herangezogen wird (standardmäßig Massenbereich 4000 bis 10000 Dalton) erweitert wird, liegt der Median für das relative Wachstum des entsprechenden Isolates knapp oberhalb der Grenze (dann Median

gerundet 0,41). In nachfolgenden/vertiefenden Studien sollte ein größeres Kollektiv von Stämmen mit MHKs nahe der EUCAST-Grenzwerte getestet werden, um zu untersuchen, ob die Einstellungen der automatisierten Auswertungssoftware für diese Grenzfälle optimiert werden können.

Insgesamt wachsen Non-Fermenter im Vergleich zu *Enterobacteriaceae* langsamer, weisen offenbar weniger ribosomale Proteine auf, welche diejenigen sind, die im MALDI-TOF Massenspektrum detektiert werden^{64,65}. Dies resultiert in geringere Intensitäten im generierten Spektrum, folglich auch in einen geringeren Wert für das „absolute Wachstum“ der automatisierten Auswertung. Dies ist schließlich der Diskriminationsfähigkeit des Testes für Spezies mit längerer Generationszeit abträglich, da ein Unterschied im Wachstum nicht so deutlich hervortritt. Weil unter den fünf aufgetretenen *P. aeruginosa* (darunter ein Paar von demselben Patienten im Rahmen der Doppelbestimmungen) nur ein gegen Ciprofloxacin auch nur knapp resistentes Isolat war, ist die Stichprobe für endgültige Aussagen zu klein. Diese Studie lässt trotzdem die Vermutung zu, dass andere Versuchsbedingungen zu eindeutigeren Ergebnissen führen könnten. Eine höhere Einsaat, längere Inkubationszeit oder das Festlegen eigener Grenzwerte erscheint als Lösung denkbar (vgl. Kapitel 3.6 und 4.3.4). In Versuchen aus der Subkultur mit denselben Isolaten, zeigten diese schon nach 2,5 Stunden im Kontrollansatz ausreichendes Wachstum, wenn eine optische Dichte von 0,007 (statt 0,0035) eingesetzt wurde. Allerdings war in diesem Ansatz der resistente Stamm ganz eindeutig falsch empfindlich. Bei einer Einsaat von OD= 0,01 konnte für alle 4 Stämme die korrekte Zuordnung erfolgen. Der resistente Erreger konnte bei einer OD= 0,02 noch deutlicher als solcher herausgearbeitet werden, bei korrekter Zuordnung auch der empfindlichen Isolate. Für Antibiotika mit steiler *time-kill*-Kurve (z.B. Fluorchinolone) kann festgehalten werden, dass eine höhere Einsaat von mindestens OD= 0,01 bei *P. aeruginosa* zu eindeutigeren Ergebnissen führt. Allerdings zeigten dann alle Stämme einen falsch resistenten Phänotyp für TZP. Im Abschnitt 4.3.4 wird weiter darauf eingegangen werden.

Unter den klinischen Proben hatte es auch ein *K. pneumoniae* Isolat gegeben, welches mittels Teststreifen eine MHK von 3 mg/L aufgewiesen und damit knapp oberhalb des resistenten Grenzwertes gelegen hatte. Der Median der RG-Werte hatte 0,45 betragen und somit war das Isolat, ebenfalls knapp oberhalb des MBT-ASTRA-Grenzwertes, korrekter Weise als resistent eingestuft worden. Alle weiteren resistenten Stämme hatten RGs über 0,8 gezeigt. Alle empfindlichen Isolate wiederum, auch

die, die mit einer MHK von 0,38 mg/L dem empfindlichen Breakpoint am nächsten lagen, zeigten RG-Werte unterhalb von 0,2. Es ist zu überlegen, ob **substanzspezifische MBT-ASTRA-Grenzwerte** eine sinnvolle Lösung darstellen. Würde man ihn für Ciprofloxacin z.B. bei 0,3 statt 0,4 wählen, wären alle aufgetretenen Erreger richtig getestet worden.

Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Höhe des RG-Wertes mit der MHK ergaben sich in unserer Studie allenfalls Ciprofloxacin. Durch weitere Feinabstimmung der Versuchsbedingungen (Inkubationszeit, Antibiotikakonzentration, Keimdichte) kann dieses Verhältnis unter Umständen deutlicher herausgearbeitet werden. Es ist jedoch fraglich, ob es sich bei allen antimikrobiellen Substanzen auf diese Art abbilden lässt, da das Wachstum und somit der RG-Wert nach kurzer Inkubationszeit, wie bereits erwähnt, sicherlich auch von der *time-kill*-Kurve der Substanz abhängt.

Beim Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim konnte durch Nachtestung aus der Subkultur unter Beibehaltung des MBT-ASTRA-Grenzwertes von 0,4 volle Übereinstimmung mit der konventionellen Methode erzielt werden. Wie bereits beschrieben war ein Isolat unter dem Probenkollektiv, dessen MHK von 1,5 mg/L unterhalb des applizierten Breakpoints lag, und das somit unter den Gegebenheiten korrekter Weise als empfindlich eingestuft wurde. Nach EUCAST-Kriterien fällt dieser Stamm allerdings unter die intermediäre, nicht unter die empfindliche Kategorie – eine Unterscheidung, die mit nur einem Screening-Breakpoint nicht getroffen werden kann (vgl. Kapitel 3.2.3 und 4.3.1).

Bei Cefotaxim konnte keine so deutliche Auftrennung wie bei Ciprofloxacin erreicht werden. Sowohl auf der empfindlichen, als auch auf der resistenten Seite befanden sich Stämme, die nahe dem Grenzwert 0,4 lagen. Das könnte dadurch erklärt werden, dass die bakterizide Aktivität *in vitro* bei β -Laktamen zeit-, während sie bei Fluorchinolonen konzentrationsabhängig ist^{11,60}. Über eine Verlängerung der Inkubationszeit könnte für Betalaktam-Antibiotika eventuell eine ebenso deutliche Auftrennung erzielt werden. Oder im Umkehrschluss könnte das bedeuten, dass gewisse Substanzen eine längere minimale Bebrütungszeit brauchen, als andere, da die *time-kill*-Kurve flacher verläuft und weitgehend konzentrationsunabhängig ist.

Weil unter den Patientenproben nur wenige Erreger waren, die MHKs nahe der Grenzwerte aufwiesen, kann zur Linearität oder Art der Beziehung der beiden unter-

suchten Testsysteme keine endgültige Aussage getroffen werden. Eine derartige Verteilung ist bei einem nicht selektionierten Probenkollektiv jedoch zu erwarten, da die Verteilung der MHKs in der Natur meist bimodal ist. Niedrig resistente Stämme sind selten, es dominieren eindeutig empfindliche oder eindeutig resistente.

4.3.3. Piperacillin/Tazobactam

Die geringste Sensitivität und Spezifität konnte für das Kombinationspräparat Piperacillin/Tazobactam erzielt werden. Um dies zu verbessern, wäre es – wie oben beschrieben – auch denkbar, den MBT-ASTRA-Grenzwert für diese Substanz höher zu wählen (z.B. bei 0,6). Somit würde die Zahl falsch resistenter Klassifikationen minimiert. Alle fehlerhaften Zuordnungen während der Hauptstudie konnten durch Nachtestung berichtigt werden. Sie waren wider Erwarten nicht bei Isolaten mit grenzwertigen MHKs aufgetreten.

Es ist eine interessante Fragestellung, ob Kombinationspräparate generell mit dem neuen Test schwieriger zu untersuchen sind. Für die *time-kill*-Kurve von Piperacillin/Tazobactam wird eine initiale Plateau-Phase beschrieben, bevor es zu einer Zellreduktion kommt, die wiederum auf einem Plateau enden kann⁶⁶. Bei Substanzen mit initialer Plateau-Phase in der antimikrobiellen Aktivität ist möglicherweise eine längere Inkubationszeit notwendig, um eine deutlichere Auftrennung zu erreichen. Die parallele Testung mehrerer Konzentrationen könnte auch hier einen Lösungsansatz darstellen.

Im Rahmen der Versuche zur Verkürzung der Inkubationszeit traten vier Stämme auf, die auch durch wiederholte Testung nach der bewährten dreistündigen Methode nicht das richtige Resultat erbrachten. Die zwei falsch-empfindlichen Isolate (eine *K. pneumoniae* und ein *E. coli* aus jeweils aeroben Kulturflaschen) wurden bereits unter 4.3.1 diskutiert. Auch zwei „falsch resistente“ Zuordnungen ergaben sich bei der Untersuchung von Piperacillin/Tazobactam. Dabei handelt es sich um einen *E. coli* und einen *P. aeruginosa*. Die Anzahl der während des Studienzeitraums aufgetretenen Fälle von *P. aeruginosa* ist zu gering, um die These aufstellen zu können, dass der MBT-ASTRA Test für diese Spezies nicht funktioniert. Dennoch gaben die Beobachtungen Anlass zu weiterführenden Versuchen aus der Subkultur. Bei der Gattung *Pseudomonas* erschien das bereits erwähnte höhere Inokulum förderlich zu sein, um

ein deutlicheres Signal in der Kontrolle zu erzielen. Wie oben beschrieben könnte dies in einem langsameren Wachstum oder möglicherweise geringerer Mengen ribosomaler Proteine begründet liegen. Das höhere Inokulum in der Nachtestung aus der Subkultur führte jedoch zu einem durchweg falsch resistenten Phänotyp bei *P. aeruginosa* gegen Piperacillin/Tazobactam, wie nachfolgend dargestellt.

4.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Weitere Untersuchungen zur Optimierung des Ansatzes für die Gattung *Pseudomonas* ergaben nicht uneingeschränkt zufriedenstellende Ergebnisse. Die Substanz Cefotaxim ist bei dieser Erregergruppe ohnehin wegen intrinsischer Resistenz hinfällig. Für Ciprofloxacin konnte mit einer höheren anfänglichen Einsaat von $OD_{600} = 0,01$ bis $0,02$ bei zweieinhalb-stündiger Inkubation differenziertere Resultate erzielt werden, da für den Kontrollansatz ohne Antibiotikum ein Massenspektrum mit höheren Intensitäten generiert werden konnte. Dadurch treten Unterschiede bei empfindlichen Isolaten deutlicher hervor.

Für die Kombination Piperacillin/Tazobactam jedoch trat dabei ein neues Problem auf, die mehrfach erwähnte „Pseudoresistenz“. Bei *P. aeruginosa* gibt es laut EUCAST kein MHK-Intervall, in dem die Erreger als intermediär eingestuft werden: mit einer MHK von kleiner oder gleich 16 mg/L gelten Isolate als empfindlich, liegt der Wert darüber als resistent. Die MHKs der Studien-Isolate lagen mit 2 mg/L , 3 mg/L , 6 mg/L und 64 mg/L weit von der kritischen Breakpoint-Konzentration entfernt.

Ausgehend von einer Übernachtskultur auf Blutagar wurden verschiedene Inkubationsbedingungen und –kombinationen untersucht (Keimdichte, Antibiotikakonzentration, Temperatur), wodurch sich das Problem jedoch nicht lösen ließ.

Auch bei der geringen Einsaat von $OD = 0,007$ war das Massenspektrum dem Kontrollansatz identisch. Daraufhin wurde getestet, ob die Erreger im Sinne des Inokulum-Effektes für TZP bei noch geringerer Ausgangsdichte empfindlicher sind, und ob bei dieser Spezies eine höhere Antibiotikakonzentration notwendig ist (vierfache MHK). Auch die Inkubation bei 29 °C wurde untersucht, da *P. aeruginosa* ein anderes Temperaturoptimum als die *Enterobacteriaceae* aufweist. Nach zweieinhalb Stunden Inkubation konnte nur bei einer $OD = 0,007$ ein ausreichendes Wachstum verzeichnet werden, wobei dieses nicht einmal durch die vierfach höhere Konzentra-

tion gehemmt werden konnte. Im händischen Abgleich der Spektren präsentierten sich gleich ausgeprägte Peak-Intensitäten.

Die Variabilität der MHKs wird auch bei *Pseudomonas aeruginosa* durch den Inokulum-Effekt beeinflusst und dieser könnte eine mögliche Erklärung für die „Pseudoresistenz“ im MBT-ASTRA Test darstellen. Ebenso spielt er dann eine Rolle, wenn eine Infektion mit hoher Keimdichte vorherrscht ¹¹. Dies könnte durch Einsatz geringerer Keimdichten zu Beginn der Inkubation umgangen werden, wie z.B. für die Mikrodilutionsmethode standardisiert (5×10^5 KBE/mL) ¹². Dann wäre aber für *Pseudomonas sp.* Eine längere Inkubationsdauer nötig, um ein ausreichendes Signal im Massenspektrum zu erlangen. Dass Betalaktam-Antibiotika ihre bakterizide Wirkung hauptsächlich zeitabhängig entfalten, spräche auch für eine längere Inkubationsdauer. Es erscheint durchaus denkbar, dass für manche Erreger-Substanz Testpaare andere Versuchsbedingungen angewandt werden müssen. Der längere postantibiotische Effekt, den z.B. Fluorchinolone auf Gram-negative Stämme haben, könnte ein weiterer Grund für die dort deutlicheren Ergebnisse sein.

Schwierigkeiten bei der Untersuchung des Verhaltens der Spezies *P. aeruginosa* gegenüber Betalaktamen werden auch bei der Arbeit von Sparbier et al. beobachtet ⁵⁸. Die Arbeitsgruppe schlägt z.B. vor, den MBT-ASTRA Cut-off in manchen Fällen höher zu wählen, was aber ein größeres Risiko für nicht ganz eindeutige Ergebnisse birgt.

Die Empfindlichkeitsprüfung von *Pseudomonas aeruginosa* bezüglich Betalaktam-Antibiotika stellt sich jedoch auch mit den gängigen Automaten (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek und Vitek2) als schwierig heraus, wie eine vergleichende Studie von Juretschko et al. zeigen konnte ⁶⁷. In dieser Multicenter-Studie wurden sowohl lokale klinische Isolate als auch verblindet vorgegebene und bekannte Stämme getestet und die Ergebnisse anschließend mit mehreren Referenzmethoden abgeglichen. Es kamen sechs verschiedene β -Laktam Antibiotika mit Vertretern aus den einzelnen Klassen zum Einsatz, unter anderem das in dieser Studie verwendete Kombinationspräparat Piperacillin-Tazobactam. Dabei traten bei allen vier automatisierten Testsystemen nach CLSI-Kriterien inakzeptabel hohe Fehlerquoten auf. Für TZP jedoch in diesem Fall der größere Fehler des „falsch-empfindlichen“ Phänotyps. Die Autoren geben zu bedenken, dass die angemessene Methode zur Testung von *P. aeruginosa* und Betalaktam-Antibiotika von der für andere Spezies abweichen könnte.

Sogar die Gradienten-Diffusionsmethode, welche den MHK-Teststreifen zugrunde liegt und als sehr robust und verlässlich gilt, ist bei der Testung von Piperacillin-Tazobactam nicht immer zielführend. Die EUCAST gab unlängst für die Benutzung der Produkte zweier Hersteller Warnhinweise heraus bezüglich der Empfindlichkeitsprüfung von *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa* ⁶⁸. Dies zeigt die Wichtigkeit der ständigen kritischen Hinterfragung der erhobenen Befunde auf, aber auch von bestehenden Prozessen der Routinediagnostik.

4.4. Beurteilung der Praxistauglichkeit

In dieser evaluativen Studie über die Anwendbarkeit des MBT-ASTRA Assays an echten klinischen Proben kann eine positive erste Bilanz gezogen werden. Mit nur wenigen Ausreißern wurde eine gute Korrelation der Ergebnisse mit der konventionellen Methode gefunden (vgl. Kapitel 3.2 und 4.3).

Eine Einschränkung ist beispielsweise, dass Mischkulturen mit zwei oder mehr Gram-negativen Erregern nicht direkt aus der Blutkultur getestet werden können, v.a. wenn die Isolate unterschiedliche Resistenzmuster aufweisen. Diese Mischkulturen kommen allerdings in nur ca. 4-5% der positiven Blutkulturen vor und sind auch mit den etablierten Methoden zur Antibiotika-Resistenzbestimmung nicht testbar. Die Erreger müssen zunächst in der Subkultur vereinzelt und dann getrennte Antibiotogramme erstellt werden. Genauer gesagt ist der MBT-ASTRA Test unter Vorbehalt, also als Screening-Test, durchaus einsetzbar. Denn wenn ein resistenter Stamm vorliegt, würde dieser sich vermehren und detektiert werden, folglich wäre das getestete Medikament für eine Therapie ungeeignet. Das ist für den behandelnden Arzt die interessierende Kernaussage. Bei gleicher Resistenzlage wäre ohnehin das gleiche Ergebnis zu erwarten.

Weitere Studien auch an Gram-positiven Stämmen müssen zeigen, ob es möglich ist, den gleichen Versuchsansatz auf alle Bakteriengattungen und -stämmen anzuwenden. Unter Umständen wird eine vorherige Identifikation nötig sein, um das richtige Test-Setting auszuwählen, was die *time-to-result* um ca. 30 Minuten verlängern würde. Bei einzelnen Proben stellte sich im Nachhinein heraus – ob durch Verunreinigung oder Mischinfektion – dass sich in der Blutkultur auch Gram-positive (z.B. *S. epidermidis*) oder anaerobe Bakterien (z.B. *Bacteroides fragilis*) befunden hatten. Obligat anaerobe Bakterien können wegen ihrer Wachstumsanforderungen unter den

applizierten Versuchsbedingungen das Ergebnis nicht beeinflussen. Aber auch die wenigen Mischkulturen mit Gram-positiven Erregern erbrachten für die im Fokus stehenden Gram-negativen Stäbchenbakterien die erwünschte korrekte Zuordnung. Denkbar wäre, dass beide Isolate dasselbe Resistenzverhalten aufwiesen und im Test deshalb nicht interferierten. Andererseits könnten die Gram-positiven Stämme auch – im Sinne einer Verunreinigung – in deutlich geringerer Zahl vorhanden gewesen, und deshalb nicht ins Gewicht gefallen sein. Außerdem gilt es die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu bedenken. Die hier erarbeiteten Versuchsbedingungen könnten allerdings auch für Gram-positive Kokkenbakterien schlicht nicht den geeigneten Rahmen darstellen. Als versuchsweise eine Blutkultur mit *Staphylococcus epidermidis* zusätzlich entsprechend der eigentlichen Proben bearbeitet wurde, zeigte sich im Kontrollansatz kein ausreichendes Wachstum. Natürlich müssten weitere Studien diese Beobachtung verifizieren.

Der mehrfach angesprochene Punkt, dass mit nur einem Screening-Breakpoint ein intermediärer Phänotyp nicht diskriminiert werden kann, ließe sich möglicherweise über die Testung einer Antibiotika-Verdünnungsreihe lösen und erfassen. In einem derartigen aufwändigeren Versuchsaufbau wäre dann auch eine Korrelation mit der MHK vorstellbar, analog der Mikrodilutionsmethode. Das würde zwar zunächst die Testung arbeitsintensiver gestalten, durch spätere Automatisierung unter erheblichem Informationszugewinn wieder vereinfachen. Ob Anaerobier in einem speziellen Setting dieser Methode zugeführt werden können, muss in weiteren Studien adressiert werden.

Der klare Vorteil liegt in der theoretisch universellen Einsetzbarkeit. Durch die phänotypische Herangehensweise können z.B. auch neue Resistenzmechanismen nicht übersehen werden. Es konnten sogar bereits erste Daten zur Anwendung der MBT-ASTRA Methode bei der oft langwierigen Identifikation und Resistenztestung bei Mykobakterien gesammelt werden. Im Vergleich zu den Standardmethoden zeigten sich vergleichbare Umsatzzeiten für *M. tuberculosis* und ein Zeitgewinn von durchschnittlich einer Woche für nichttuberkulöse Mykobakterien ⁶⁹. Allerdings geben die Autoren zu bedenken, dass erst eine weitere Optimierung und Automatisierung die Vorteile der Massenspektrometrie überwiegen lassen und die Ablösung der etablierten Verfahren möglich machen würde.

4.4.1. Handhabung und Integrierbarkeit in den Routineablauf

In vielen Laboren sind bereits MALDI-TOF Massenspektrometer und die nötigen Verbrauchsmaterialien vorhanden. Der Workflow für den MBT-ASTRA ist gut in den Laboralltag zu integrieren, da er einfach ist und eine vergleichsweise kurze *hands-on*-Zeit hat. Zudem benötigen die MALDI-TOF Anwender kein zusätzliches Training, sie sind bereits für die Probenaufbereitung und den Umgang mit dem Gerät eingearbeitet. Die Einstellungen des Massenspektrometers müssen zur Durchführung des Testes nicht verändert werden. Wenn das Spektrum aus der Wachstumskontrolle zur Erreger-Identifikation herangezogen wird, kann ein weiterer Arbeitsschritt eingespart werden. Des Weiteren wird nur eine geringe Menge Biomaterial für die Testung benötigt. Sie kann daher potentiell zu einem sehr frühen Zeitpunkt beginnen.

4.4.2. Mögliche Fehlerquellen

Bei allen nicht maschinell durchgeführten Arbeitsschritten sind Fehler durch den Anwender möglich. Für diese Methode sei speziell auf zwei hingewiesen. Zum einen ist es von essentieller Bedeutung, dass sich zu Beginn der Inkubationszeit nicht zu viele bakterielle Zellen im Ansatz befinden, da dies sonst zu falsch resistenten Ergebnissen führt („linearer Bereich“). Für diese Arbeit wurde das mithilfe eines Photometers sichergestellt und überprüft. Dessen Funktionalität und korrekte Eichung war stets zu kontrollieren.

Des Weiteren muss bei der Probenauftragung genau vorgegangen werden, da feine Differenzen im Wachstum detektiert werden und den Unterschied zwischen empfindlich oder resistent ausmachen können. Unsauberes Arbeiten kann zu falschen Ergebnissen führen, da die Proteine unter Umständen nicht gleichmäßig mit der Matrix ko-kristallisieren und vom Gerät nur bestimmte Stellen mit dem Laser angesteuert werden. Aus diesem Grund wurden die Proben in dieser Studie in vierfacher Ausfertigung gemessen, wodurch das Signal eine statistisch abgesicherte Gewichtung erhält. Für den Alltagsgebrauch erscheint das sehr zeitaufwendig. Ebenso sollte gründlich darauf geachtet werden, dass bei der Reinigung der Probenträger keine Rückstände zurückbleiben, die das Signal der neuen Probe überlagern würden.

Bei Proben mit großer Streuung in der automatisierten Auswertung (Box-Plot-Diagramm), oder Ergebnissen nahe den Grenzwerten, lohnt sich die Prüfung und

Beurteilung der Rohspektren. So kann beispielsweise Messrauschen erkannt und vom Auswertungsalgorithmus ausgenommen werden (siehe Kapitel 3.1, sowie 3.3).

4.4.3. Zeitaufwand

Zum Abstecken des benötigten Zeitaufwandes soll die Bebrütung in den Blutkultur-Flaschen außer Acht gelassen werden, da diese allen Resistenztests voraus gehen muss und somit immer eine Verzögerung darstellt ^{70,71}. Als grobe durchschnittliche Zeitangabe für die Keimdetektion können bei Gram-negativen Bakterien 10-12 Stunden veranschlagt werden ⁷². Außerdem muss erwähnt werden, dass ablaufbedingt die sofortige Bearbeitung einer positiv gemeldeten Probe nicht in jedem Fall möglich ist, was auch für jede Form der nachfolgenden Testung gilt. Vom Idealfall ausgehend, wäre das Ergebnis der Resistenztestung dieser drei Substanzen für einen Stamm nach vier bis fünf Stunden verfügbar. Das beinhaltet die dreistündige Inkubationszeit und ein bis zwei Stunden Probenvor- und Nachbereitung, sowie die Auswertung. Je routinierter der Anwender, desto kürzer und je mehr Proben parallel angesetzt werden müssen, desto länger ist die benötigte Arbeitszeit. Natürlich würde der Test nach ausreichender Evaluation von einer Automatisierung enorm profitieren. Damit würden sowohl Fehler minimiert, als auch Zeit und Personalkosten gespart. Abschließen ist zu sagen, dass der Zeitgewinn sich vor allem bei schnell wachsenden Organismen ergibt. Bei dem momentanen Arbeitsaufwand des MBT-ASTRA wäre ein gezielter Einsatz in Form eines Schnelltestes am effizientesten, beispielsweise auf die Substanzen hin, mit denen der Patient behandelt ist. Es könnte weiterhin Zeit eingespart werden, indem weniger Spots pro jeweiliger Probe aufgetragen und gemessen würden. Dadurch würde der Test jedoch anfälliger für Ausreißer.

4.5. MBT-ASTRA im Kontext der gegenwärtigen Resistenztestung

Die Diagnostische Lücke, die durch die schnelle Verfügbarkeit der Erregeridentifikation durch MALDI-TOF MS im Gegensatz zur langwierigen Resistenztestung entsteht, gilt es zu schließen. Dafür werden die verschiedensten Ansätze verfolgt.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen und beschreiben, dass die untersuchte MBT-ASTRA Methode sehr stabil ist und eine gute Sensitivität und Spezifität aufweist. Die wenigen Ausnahmen kamen hauptsächlich bei der Substanz Piperacillin/Tazobactam

oder der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* vor, welche auch für andere, gängige Verfahren der Resistenztestung Problemfälle darstellen. Nachfolgend werden verschiedene Aspekte anderer Methoden vergleichend beleuchtet.

4.5.1. Automatisierte Testsysteme

4.5.1.1. Performance

Leverstein-van Hall et al. evaluierten die automatisierten Systeme BD Phoenix, VITEK 1 und VITEK 2 bezüglich ihrer Fähigkeit zur Detektion von Extended-Spektrum-Betalaktamasen in multiresistenten *Klebsiella sp.* und *E. coli* ⁷³. Dabei handelt es sich um im mikrobiologischen Alltag gängige Methoden, gegen die sich jeder neue Resistenztest zunächst behaupten muss. Wie auch in der vorliegenden Arbeit wurden Gram-negative Bakterien untersucht und ein MHK-Teststreifen (Etest ESBL) als Referenzmethode gewählt. Bei den klinischen Isolaten zeigte der VITEK 2 eine schwächere Leistung als der Phoenix. Als Nachteile dieser Methoden wurde an erster Stelle die lange Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse genannt. Außerdem wird eine recht große Anzahl an lebender Organismen benötigt und die Anschaffungskosten der Automaten sind hoch. Beim verwendeten Etest ESBL gaben die Autoren unter anderem zu bedenken, dass Inhibitionszonen schwer zu lesen und interpretieren sind, z.B. erschweren sporadische Mutanten innerhalb der Inhibitionszone die Auswertung. Bestimmte Genotypen können nicht unterschieden werden. Phänotypische Ansätze können außerdem nicht zwischen chromosomalen oder Plasmid-kodierten Enzymen differenzieren, was wichtig für die Krankenhaushygiene ist, da Plasmide durch horizontalen Transfer zu ESBL-Ausbrüchen führen können ⁷³.

Auch andere Arbeitsgruppen verglichen in ihren Studien die Leistungen der gängigen automatisierten Testsysteme bei Gram-negativen Bakterien ^{74,75}. Es wurde die Performance bei der Untersuchung spezieller Substanzen adressiert und die Agar-Dilution als Referenzmethode verwendet. Je nach Fragestellung wiesen jeweils unterschiedliche Geräte die höchste Sensitivität und Spezifität auf. Die Autoren schlagen die Kombination mit ergänzenden Untersuchungen wie z.B. PCR vor ⁷⁴. Dies würde allerdings den positiven Aspekt der Zeit- und Arbeitersparnis wieder aufhe-

ben. Diese Publikationen zeigen die Wichtigkeit der Evaluation der Reliabilität und der ständigen Optimierung neuer Testsysteme auf.

Die Detektion von Resistenzgenen mit Multiplex-PCR kann nicht alle Resistenzmarker erfassen, ist teuer und die genetische Heterogenität vor allem Gram-negativer Stämme bereitet Nukleinsäure-basierten Ansätzen zur Resistenztestung Schwierigkeiten ⁷⁶. Ein weiterer Ansatz kombiniert zur Lokalisation von SNPs in den PCR-Amplifikaten diese mit MALDI-TOF MS ⁷⁷.

4.5.1.2. *Time to result*

In einer Studie von Eigner et al. wurden die Geräte Phoenix und VITEK 2 bezüglich ihrer Leistung verglichen, inklusive der nötigen *time-to-result* [TTR] ⁷⁸. Die *time-to-result* wurde in dem Moment gemessen, als alle endgültigen Ergebnisse einer Testkarte vorlagen, wobei der Phoenix signifikant mehr Zeit benötigte. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung lagen beispielsweise für *Enterobacteriaceae* gerundet und im Durchschnitt nach 11,7 Stunden bei Einsatz des Phoenix und nach 7,5 Stunden bei der des VITEK 2 vor. Nonfermenter bedürfen einer längeren Bebrütungszeit. Die alle getesteten Spezies umfassende TTR lag insgesamt höher, wie auch eine jüngere Studie bestätigt ⁷⁹. Maelegheer et al. setzten kürzlich in ihrer Studie das Inokulum für die Resistenztestung im Phoenix direkt ausgehen von positiven Blutkulturflaschen an, ohne vorherige Inkubation auf Festmedium ⁸⁰. Zur Unterscheidung zwischen ESBL und nicht-ESBL produzierenden *E. coli* Stämmen wurde das Wachstum in Gegenwart von Dritt- und Viertgenerations-Cephalosporinen beurteilt. Die TTR ging meist über sieben Stunden hinaus. Zu diesem Zeitpunkt würde demnach mit dem MBT-ASTRA Assay eine Zeitersparnis von mindestens drei Stunden erzielt werden.

4.5.2. Vergleich mit anderen massenspektrometrischen Ansätzen

Durch ihr semiquantitatives Prinzip handelt es sich bei der MBT-ASTRA Methode um eine Technik, die auf alle Fragestellungen angewendet werden kann. Ohne Einschränkungen bezüglich Bakterienstämmen und den unterschiedlichen Resistenzarten, oder Antibiotika mit den verschiedenen Wirkmechanismen – im Gegensatz zu den übrigen bisher veröffentlichten Ansätzen zur schnellen Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS. Dies konnte in dieser Arbeit an einem Probenkollektiv bestätigt und

Hinweise gesammelt werden, in welcher Richtung Adjustierungen möglich sind. Die wenigen Fehlmessungen erlauben keine Rückschlüsse auf spezifische Schwächen der Methode. Im Gegensatz dazu liegt es in der Natur des Betalaktamase-Assay, dass dieser als einzigen Resistenzmechanismus Betalaktamasen detektieren kann. Einschränkend beim SILAC-Assay ist, dass im Vorfeld alle Spezies und Gattungen auf die doppelgipfeligen Peaks gescreent werden müssen. Es müssen geeignete, reproduzierbar auftretende Peaks ausgewählt und die entsprechenden Proteinmassen archiviert werden, zum späteren Abgleich mit der eigentlichen Probe. Nicht alle Antibiotika zielen auf die Proteinbiosynthese der Mikroorganismen. So scheint diese Methode je nach Substanz unterschiedlich eindeutige Ergebnisse zu erbringen, da unter Umständen bis zu einem gewissen Grad auch bei empfindlichen Isolaten isoto-penmarkierte Aminosäuren im Proteinspektrum zu finden sind. In diesem Fall ist es schwer, eine Grenze zu ziehen. Außerdem wird ein spezielles Medium benötigt, welches die markierte Aminosäure entbehrt.

Eine jüngst veröffentlichte Studie von Idelevich et. al verfolgt einen ganz ähnlichen, wie den hier untersuchten phänotypischen Ansatz zur schnellen Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF MS, jedoch im Mikrotropfen Format ⁸¹. Die Arbeitsgruppe untersuchte klinische Isolate von *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* bzgl. des Resistenzverhaltens gegenüber der Substanz Meropenem. Sie führten sowohl den Inkubations-Schritt, als auch die Trennung von Bakterienzellen und Nährmedium, sowie antibiotischer Substanz (mithilfe von Papiertüchern und des entstehenden Kapillareffekts) bereits auf den MALDI Probenträgern (Einmalmaterial) durch. Hierzu war allerdings eine 18-stündige Inkubationsdauer notwendig. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass die stetige Weiterentwicklung des hier präsentierten, quantitativen Ansatzes viel Potential für eine schlussendliche Automatisierung und Kombination mit der bereits routinemäßig durchgeführten Erreger-Identifikation mittels MALDI-TOF MS birgt.

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie kann auch in der Proteomik zum Einsatz kommen, z.B. zur Analyse des Transkriptoms resistenter Isolate unter verschiedenen Bedingungen ⁸². Dabei kann diese einen wertvollen Informationszugewinn zum eher statischen Genom darstellen. Für den Routine-Einsatz ist die Proteom-Analyse jedoch zu arbeitsaufwendig.

4.5.3. Andere in Entwicklung befindliche Techniken

Es werden viele weitere, interessante Ansätze zur schnelleren Antibiotika-Resistenztestung verfolgt ⁷⁶. Da sich diese Studie mit einem weitestgehend phänotypischen Ansatz beschäftigte, sollen exemplarisch vier weitere skizziert werden.

Mittels der Durchflusszytometrie können Bakterien auf ihre Intaktheit hin untersucht werden, nachdem sie antimikrobiellen Substanzen ausgesetzt waren. Der fluoreszierende Farbstoff penetriert nur die in ihrer Integrität beeinträchtigte Zellwand sterbender oder toter Zellen. Faria-Ramos et al. präsentieren einen Ansatz, mit Hilfe dessen ESBL-Produzenten innerhalb einer Arbeitszeit von mindestens drei Stunden identifiziert werden können ⁸³. Einschränkungen dieser Methode beinhalten die Autofluoreszenz gewisser Spezies, bzw. die Färbung der bakteriellen Zellen auch bei subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen ⁸⁴. Außerdem erfordert es einen großen Arbeitsaufwand zur Validierung der Methode und einer klinischen Datenbank. Des Weiteren funktioniert dieser Test nur mit Zellen, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, was eine Vorinkubation der Erreger notwendig macht. Ein standardmäßig ausgestattetes mikrobiologisches Labor müsste zunächst ein FACS-Gerät anschaffen und würde eine spezielle Fachkraft zu dessen Bedienung benötigen ^{76,83}. In einem Teil der Studie von Soejima et al. wurde das Blut von acht Säuglingen/Kleinkindern mit Bakteriämie ohne vorherige Inkubation der Erreger direkt durchflusszytometrisch untersucht ⁸⁵. Durch Messungen zum Zeitpunkt des Beginns der Antibiotikatherapie und zwei weiteren (fünf oder elf und 23 Stunden) konnte die Effektivität der Therapie in Echtzeit mitverfolgt werden. Die Autoren geben allerdings ein Detektionslimit zu bedenken. Deshalb könnte diese Methode in der Form auf die Anwendung bei Kindern beschränkt bleiben, welche Bakteriämien mit einer höheren Erregeranzahl aufweisen ⁸⁵.

Alle Prozesse lebendiger Organismen verbrauchen oder produzieren Hitze. Die isothermale Mikrokolorimetrie ermöglicht z.B. die zeitgleiche Messung der netto Hitzeproduktion von sich vermehrenden Mikroorganismen. Es lässt sich somit die Reaktion von Bakterien auf die Zugabe von Antibiotika direkt mitverfolgen. Von Ah et al. gelang zwar keine Reduktion der Zeit bei der Bestimmung der MHK, jedoch werden neue Informationen zugänglich. Der Effekt einer Substanz auf die Aktivität des Mikroorganismus kann direkt beobachtet werden. Außerdem kann die Wirkweise subinhibitorischer Konzentrationen beurteilt werden ⁸⁶. Eine weitere Arbeitsgruppe

konnte die Anwendbarkeit dieser Methode auf die Untersuchung antimikrobieller Effekte verschiedener Substanzen auf Biofilme zeigen⁸⁷. Dabei wurde *Pseudomonas putida* als Modellorganismus verwendet und verschiedene Toxizitätsmechanismen beleuchtet. Auch in diesem Fall liegt das Augenmerk der Autoren auf den im Vergleich mit den herkömmlichen Methoden zusätzlich gewonnenen Informationen, nicht auf dem zeitlichen Aspekt.

Resistenztestung kann ebenso in Mikrodroplet-Format erfolgen⁸⁸. Über die Messung der Fluoreszenz in 100-nl-Tröpfchen gelang auch Baraban et al. eine kontinuierliche Wachstumsdetektion allerdings im Kleinstansatz. Dabei wurde die Inkubationszeit mit zehn Zellen/Tröpfchen begonnen. Der Aufbau eines Konzentrationsgradienten konnte mit kleineren Abstufungen erfolgen. Auf diese Weise können Merkmale wie der Einfluss der Umgebung und der Größe der Population untersucht werden.⁸⁸

Eine weitere vergleichbare Herangehensweise stellt die automatisierte Echtzeit-Mikroskopie dar. Die aus immobilisierten Bakterienzellen entstehenden Kolonien konnten simultan identifiziert und quantifiziert werden, indem Variablen wie z.B. Masse, Wachstumsmuster und Oberflächenbeschaffenheit berücksichtigt und anschließend die Menge an KBE berechnet wurden⁸⁹. Eine weitere Studie weitete den Einsatz dieser Technik auf Resistenztestung an einem Kollektiv von Patienten mit beatmungsassoziierten Pneumonie aus⁹⁰. In einigen Fällen hätte eine Anpassung der antibiotischen Behandlung früher erfolgen können. Diese Technik befindet sich noch in der Entwicklung und die tatsächlich resultierende Zeitersparnis und Praktikabilität bleibt abzuwarten.

4.6. Ausblick

Einige vielversprechende und verschiedene Technologien bemühen sich um eine Verkürzung der für die Empfindlichkeitsprüfung nötigen Zeit. Welche davon sich durchsetzen und Einzug in die mikrobiologische Diagnostik erhalten wird, ist noch nicht abzusehen. In dieser Studie konnten erste Daten zur klinischen Anwendbarkeit eines neuen semi-quantitativen MALDI-TOF MS basierten Testes auf Patientenproben gesammelt werden. Die Ergebnisse sind mit den kürzlich veröffentlichten *proof-of-principle* Studien vergleichbar, welche retrospektiv in einem sorgfältig geplanten Rahmen stattgefunden hatten^{52,58}. Sie deuten auf eine relevante Zeitersparnis bei

guter Übereinstimmung zu konventionellen Methoden hin. Dabei liegt der Vorteil der Massenspektrometrie darin, dass früher und kleinere Wachstumsunterschiede über den Nachweis von Zellproteinen erfasst werden können. Potentiell ist hierbei eine differenziertere Diskriminationsfähigkeit gegeben, als dies bei den bestehenden automatisierten Testsystemen der Fall ist, welche Wachstum über Fluoreszenz oder Trübung detektieren. Der in dieser Arbeit vorgestellte, neue MALDI-TOF-basierte Resistenztest (MBT-ASTRA) bedarf sicherlich noch weiterer Feinjustierung. Größer angelegte Studien müssen die gemachten Beobachtungen bestätigen und genauer herausarbeiten. So z.B., ob es einen universellen Versuchsansatz gibt, oder ob je nach bakterieller Spezies und antibiotischer Substanz unterschiedliche Bedingungen einzuhalten sind. Eine spätere Automatisierung erscheint notwendig, um den Test in die Routine-Diagnostiklabore einzuführen. Vielleicht wird durch die Koppelung eines Bebrütungssystems mit einem Massenspektrometer in Zukunft sogar eine kontinuierliche Überwachung durch regelmäßige Zwischenmessungen möglich sein. Die hier untersuchte Methode stellt eine effiziente, akkurate, schnelle und vielversprechende potentielle Alternative zur Antibiotika-Resistenztestung dar. Die Ergebnisse dieser und kommender Studien könnten zu einer früheren Anpassung antimikrobieller Therapien beitragen.

5. Zusammenfassung

Die Implementierung der MALDI-TOF MS in die mikrobiologische Routinediagnostik brachte einen großen Fortschritt und vor allem zeitlichen Zugewinn bei der Identifikation von Bakterien und Pilzen. Dies öffnete jedoch eine zeitliche Lücke zwischen dem schnell verfügbaren Wissen über die Art des Krankheitserregers bis zum Vorliegen des Antibiotogramms. Viele Arbeitsgruppen arbeiten an verschiedenen Methoden, um diese diagnostische Lücke zu schließen. In dieser Studie wurde ein neuer, semi-quantitativer Ansatz zur schnellen Antibiotika-Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS für den Einsatz an klinischen Proben (positiven Blutkulturen) optimiert und evaluiert.

Insgesamt wurden 119 Blutkulturen von Patienten mit Gram-negativer Sepsis aus dem angegliederten Universitätsklinikum mit der neuen Methode getestet. Grundsätzlich wird hierfür das Wachstum in Gegenwart eines Antibiotikums zum Wachstum eines Kontrollansatzes (nur in Kulturmedium) ins Verhältnis gesetzt. Zur anschließenden Korrelation der Ergebnisse mit den konventionellen Methoden wurde für jede Isolat-Antibiotikum-Kombination die MHK mittels Teststreifen festgestellt, welcher erst am Folgetag abgelesen werden kann.

Eine vorliegende Resistenz gegen Drittgenerations-Cephalosporine, Ciprofloxacin und das Kombinationspräparat Piperacillin/Tazobactam konnte nach nur dreistündiger Inkubation direkt aus positiven Blutkulturen ermittelt werden. Die Zuordnung erfolgte in guter Übereinstimmung zur herkömmlichen Methode. Vorteile sind die einfache Handhabung, die Notwendigkeit von nur sehr wenig Biomaterial und die potentiell universelle Einsetzbarkeit der zugrundeliegenden Methodik.

Die Kombination der schnellen Speziesidentifikation durch MALDI-TOF MS mit diesem auf derselben Technologie basierenden Resistenztest, könnte zukünftig eine schnellere Re-Evaluierung einer antibiotischen Behandlung ermöglichen. Massenspektrometrisch können geringere Wachstumsunterschiede detektiert werden, als das z.B. durch Messung der Trübung möglich ist. Vor allem die Automatisierung dieses neuen Testes stellt eine attraktive Perspektive für mikrobiologisch-diagnostische Labore dar.

Literaturverzeichnis

1. Hof, H. & Dörries, R. *Medizinische Mikrobiologie*, (Georg Thieme Verlag, 2014).
2. Robert Koch Institut. Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS-Definitionen). (Robert Koch-Institut, www.rki.de, 2016).
3. Geffers, C. & Gastmeier, P. Nosokomiale Infektionen und multiresistente Erreger in Deutschland. *Deutsches Ärzteblatt* **108**, 87-93 (2011).
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. (ECDC, www.ecdc.europa.eu/publications, 2013).
5. Beyersmann, J., *et al.* Use of multistate models to assess prolongation of intensive care unit stay due to nosocomial infection. *Infection control and hospital epidemiology* **27**, 493-499 (2006).
6. Geffers, C., Sohr, D. & Gastmeier, P. Mortality attributable to hospital-acquired infections among surgical patients. *Infection control and hospital epidemiology* **29**, 1167-1170 (2008).
7. Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.-D., Kaufmann, S.H. & Schulz, T.F. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, (Springer-Verlag, 2012).
8. Maechler, F., *et al.* Prevalence of carbapenem-resistant organisms and other Gram-negative MDRO in German ICUs: first results from the national nosocomial infection surveillance system (KISS). *Infection* **43**, 163-168 (2015).
9. Pittet, D., Tarara, D. & Wenzel, R.P. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *Jama* **271**, 1598-1601 (1994).
10. Singer, M., *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* **315**, 801-810 (2016).
11. Courvalin, P., Leclercq, R. & Rice, L.B. *Antibiogram*, (ESKA Publishing, 2010).
12. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Discussion Document E. Dis 5.1: determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. (EUCAST, http://www.eucast.org/documents/publications_in_journals/, 2003).
13. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk Diffusion Test Manual. Version 4.0. (www.eucast.org, 2014).
14. Baker, C.N., Stocker, S.A., Culver, D.H. & Thornsberry, C. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility

- testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of clinical microbiology* **29**, 533-538 (1991).
15. Ericsson, H.M. & Sherris, J.C. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology* **217**, Suppl 217:211+ (1971).
 16. Jorgensen, J.H. & Ferraro, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **26**, 973-980 (1998).
 17. Anhalt, J.P. & Fenselau, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical chemistry* **47**, 219-225 (1975).
 18. The Nobel Prize in Chemistry 2002. Press Release. (Nobel Media AB 2014, Nobelprize.org, 2002).
 19. Holland, R.D., *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **10**, 1227-1232 (1996).
 20. Croxatto, A., Prod'hom, G. & Greub, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews* **36**, 380-407 (2012).
 21. Lottspeich, F. & Engels, J.W. *Bioanalytik*, (Springer Spektrum, 2008).
 22. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. & Schubert, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied microbiology and biotechnology* **93**, 965-974 (2012).
 23. Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Munoz-Bellido, J.L. & Gonzalez-Buitrago, J.M. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**, 1007-1012 (2011).
 24. Ferroni, A., *et al.* Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology* **48**, 1542-1548 (2010).
 25. Prod'hom, G., Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J. & Greub, G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *Journal of clinical microbiology* **48**, 1481-1483 (2010).
 26. Stevenson, L.G., Drake, S.K. & Murray, P.R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-

- time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology* **48**, 444-447 (2010).
27. Marie, T.H., *et al.* MALDI-TOF MS identification and antimicrobial susceptibility testing directly from positive enrichment broth. *Journal of microbiological methods* **141**, 32-34 (2017).
 28. Bernardo, K., *et al.* Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **2**, 747-753 (2002).
 29. Wolters, M., *et al.* MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International journal of medical microbiology : IJMM* **301**, 64-68 (2011).
 30. Papagiannitsis, C.C., *et al.* Identification of CMY-2-type cephalosporinases in clinical isolates of Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 2952-2957 (2014).
 31. Du, Z., Yang, R., Guo, Z., Song, Y. & Wang, J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry* **74**, 5487-5491 (2002).
 32. Jackson, K.A., Edwards-Jones, V., Sutton, C.W. & Fox, A.J. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of microbiological methods* **62**, 273-284 (2005).
 33. Majcherczyk, P.A., McKenna, T., Moreillon, P. & Vaudaux, P. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* **255**, 233-239 (2006).
 34. Josten, M., *et al.* Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *Journal of clinical microbiology* **51**, 1809-1817 (2013).
 35. Burckhardt, I. & Zimmermann, S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of clinical microbiology* **49**, 3321-3324 (2011).
 36. Hooff, G.P., *et al.* Characterization of beta-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *Journal of proteome research* **11**, 79-84 (2012).
 37. Hrabak, J., Walkova, R., Studentova, V., Chudackova, E. & Bergerova, T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology* **49**, 3222-3227 (2011).

38. Jung, J.S., *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of beta-lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *Journal of clinical microbiology* **52**, 924-930 (2014).
39. Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C. & Kostrzewa, M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *Journal of clinical microbiology* **50**, 927-937 (2012).
40. Monteferrante, C.G., *et al.* Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **71**, 2856-2867 (2016).
41. Carvalhaes, C.G., *et al.* Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 2132-2136 (2014).
42. Oviano, M., Sparbier, K., Barba, M.J., Kostrzewa, M. & Bou, G. Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). *International journal of antimicrobial agents* **48**, 655-660 (2016).
43. Ghebremedhin, B., Halstenbach, A., Smiljanic, M., Kaase, M. & Ahmad-Nejad, P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **15**, 5 (2016).
44. Jung, J.S., *et al.* Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **33**, 949-955 (2014).
45. Sparbier, K., *et al.* MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *Journal of clinical microbiology* **51**, 3741-3748 (2013).
46. De Carolis, E., *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *Journal of clinical microbiology* **50**, 2479-2483 (2012).
47. Marinach, C., *et al.* MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* **9**, 4627-4631 (2009).
48. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. (World Health Organization 2014, www.who.int, 2014).
49. Jorgensen, J.H. & Ferraro, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**, 1749-1755 (2009).

50. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0. (<http://www.eucast.org>, 2014).
51. Pfaller, M.A., *et al.* Comparison of fixed concentration and fixed ratio options for testing susceptibility of gram-negative bacilli to piperacillin and piperacillin/tazobactam. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **11**, 728-732 (1992).
52. Lange, C., Schubert, S., Jung, J., Kostrzewa, M. & Sparbier, K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *Journal of clinical microbiology* **52**, 4155-4162 (2014).
53. Schubert, S., *et al.* Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **13**, 701-706 (2011).
54. Carroll, K.C., *et al.* Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* **44**, 3506-3509 (2006).
55. Menozzi, M.G., *et al.* Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *Journal of clinical microbiology* **44**, 4085-4094 (2006).
56. Bogaerts, P., *et al.* Multicenter evaluation of a new DNA microarray for rapid detection of clinically relevant bla genes from beta-lactam-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 4457-4460 (2011).
57. Gibb, S. & Strimmer, K. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **28**, 2270-2271 (2012).
58. Sparbier, K., Schubert, S. & Kostrzewa, M. MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods (San Diego, Calif.)* (2016).
59. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Setting breakpoints. (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/eucast_setting_breakpoints/, 2016).
60. Ambrose, P.G., *et al.* Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **44**, 79-86 (2007).
61. Jumbe, N., *et al.* Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *The Journal of clinical investigation* **112**, 275-285 (2003).

62. The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. (<http://www.eucast.org>, 2019).
63. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Area of Technical Uncertainty (ATU) in antimicrobial susceptibility testing. (<http://www.eucast.org>, 2019).
64. Arnold, R.J., Karty, J.A., Ellington, A.D. & Reilly, J.P. Monitoring the growth of a bacteria culture by MALDI-MS of whole cells. *Analytical chemistry* **71**, 1990-1996 (1999).
65. Ryzhov, V. & Fenselau, C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Analytical chemistry* **73**, 746-750 (2001).
66. MacGowan, A.P., *et al.* A new time-kill method of assessing the relative efficacy of antimicrobial agents alone and in combination developed using a representative beta-lactam, aminoglycoside and fluoroquinolone. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **38**, 193-203 (1996).
67. Juretschko, S., Labombardi, V.J., Lerner, S.A. & Schreckenberger, P.C. Accuracies of beta-lactam susceptibility test results for *Pseudomonas aeruginosa* with four automated systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). *Journal of clinical microbiology* **45**, 1339-1342 (2007).
68. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/, 2015).
69. Ceysens, P.J., *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Combined Species Identification and Drug Sensitivity Testing in Mycobacteria. *Journal of clinical microbiology* **55**, 624-634 (2017).
70. Weinstein, M.P., *et al.* Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia. *Journal of clinical microbiology* **33**, 978-981 (1995).
71. Wilson, M.L., *et al.* Controlled evaluation of BacT/alert standard anaerobic and FAN anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia and fungemia. *Journal of clinical microbiology* **33**, 2265-2270 (1995).
72. Somily, A.M., *et al.* Time-to-detection of bacteria and yeast with the BACTEC FX versus BacT/Alert Virtuo blood culture systems. *Annals of Saudi medicine* **38**, 194-199 (2018).
73. Leverstein-van Hall, M.A., *et al.* Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology* **40**, 3703-3711 (2002).

74. He, Q., *et al.* Performance evaluation of three automated identification systems in detecting carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **15**, 40 (2016).
75. Jean, S.S., Liao, C.H., Sheng, W.H., Lee, W.S. & Hsueh, P.R. Comparison of commonly used antimicrobial susceptibility testing methods for evaluating susceptibilities of clinical isolates of Enterobacteriaceae and nonfermentative Gram-negative bacilli to cefoperazone-sulbactam. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* (2015).
76. van Belkum, A. & Dunne, W.M., Jr. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology* **51**, 2018-2024 (2013).
77. Syrmis, M.W., *et al.* Comparison of a multiplexed MassARRAY system with real-time allele-specific PCR technology for genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**, 1804-1810 (2011).
78. Eigner, U., Schmid, A., Wild, U., Bertsch, D. & Fahr, A.M. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix systems. *Journal of clinical microbiology* **43**, 3829-3834 (2005).
79. Gherardi, G., *et al.* Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **72**, 20-31 (2012).
80. Maelegheer, K. & Nulens, E. Same-day identification and antibiotic susceptibility testing on positive blood cultures: a simple and inexpensive procedure. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **36**, 681-687 (2017).
81. Idelevich, E.A., Sparbier, K., Kostrzewa, M. & Becker, K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **24**, 738-743 (2018).
82. Hrabak, J., Chudackova, E. & Walkova, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clinical microbiology reviews* **26**, 103-114 (2013).
83. Faria-Ramos, I., *et al.* A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**, E8-e15 (2013).
84. Saint-Ruf, C., *et al.* Antibiotic Susceptibility Testing of the Gram-Negative Bacteria Based on Flow Cytometry. *Frontiers in microbiology* **7**, 1121 (2016).

85. Soejima, T., Minami, J. & Iwatsuki, K. The exclusive use of flow cytometry to evaluate the antibiotic-susceptibility. *Biochimica et biophysica acta* **1820**, 1980-1986 (2012).
86. von Ah, U., Wirz, D. & Daniels, A.U. Isothermal micro calorimetry--a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC microbiology* **9**, 106 (2009).
87. Buchholz, F., *et al.* Chip calorimetry for fast and reliable evaluation of bactericidal and bacteriostatic treatments of biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 312-319 (2010).
88. Baraban, L., *et al.* Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a chip* **11**, 4057-4062 (2011).
89. Metzger, S., Frobel, R.A. & Dunne, W.M., Jr. Rapid simultaneous identification and quantitation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* directly from bronchoalveolar lavage specimens using automated microscopy. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **79**, 160-165 (2014).
90. Douglas, I.S., *et al.* Rapid automated microscopy for microbiological surveillance of ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* **191**, 566-573 (2015).

Anhänge

- Abkürzungsverzeichnis
- Abbildungs- und Tabellenverzeichnis
- Danksagung
- Veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit
- Eidesstattliche Versicherung

Abkürzungsverzeichnis

A. baumannii	Acinetobacter baumannii
Aeromonas sp.	Aeromonas Spezies
AUC	Area under the curve
°C	Grad Celsius
CIP	Ciprofloxacin
C. freundii	Citrobacter freundii
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTX	Cefotaxim
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ESBL	Extended-Spectrum Betalaktamase
ECA	Enterobacteriaceae-common-Antigen
E. aerogenes	Enterobacter aerogenes
E. cloacae	Enterobacter cloacae
E.coli	Escherichia coli
EUCAST	European Committee on antimicrobial susceptibility testing
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
4-HCCA	α-Cyano-4-hydroxymizsäure
H ₂ O	Wasser
Dest. H ₂ O	Destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Herz
k	Kilo
KBE	Koloniebildende Einheit
K. oxytoca	Klebsiella oxytoca
K. pneumoniae	Klebsiella pneumoniae

L	Liter
μ	mikro
m	milli
MALDI	matrixassistierte Laserdesorption/Ionisation
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MBT-ASTRA	MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MRGN	Multiresistentes Gram-negatives (Bakterium)
3MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen drei der vier Antibiotikaklassen
4MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen vier der vier Antibiotikaklassen
MRSA	Meticillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
M/Z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
ns	Nanosekunden
OD	Optische Dichte
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Pharmakodynamik
PK	Pharmakokinetik
RG	Relatives Wachstum
RKI	Robert-Koch-Institut
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute

RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
S. aureus	Staphylococcus aureus
SILAC	Stable isotope labeling amino acid
S. marcescens	Serratia marcescens
TFA	Metalltrifluoracetat
TOF	Time of flight
TZP	Piperacillin/Tazobactam
V	Volt
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Funktionsprinzip eines MALDI-TOF Massenspektrometers
Abb. 2	Exemplarische Darstellung des Auswertungsvorganges
Abb. 3	Verdünnungsreihe
Abb. 4	Korrelation der eingesetzten optischen Dichte mit dem resultierenden Massenspektrum
Abb. 5	Testreihe unterschiedlicher Einsaat-Dichten eines voll empfindlichen Isolates
Abb. 6	Testung unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen
Abb. 7	Analyse der Resistenzlage von 104 Blutkulturen septischer Patienten für Cefotaxim
Abb. 8	Analyse der Resistenzlage von 104 Blutkulturen septischer Patienten für Ciprofloxacin
Abb. 9	Analyse der Resistenzlage von 104 Blutkulturen septischer Patienten für Piperacillin/Tazobactam
Abb. 10	Gegenüberstellung eines Box-Plot-Diagramms mit großer Streuung und der entsprechenden Rohspektren
Abb. 11	Darstellung beider Auswertungsmöglichkeiten eines für Piperacillin/Tazobactam falsch-resistent getesteten Isolates
Abb. 12	Inter-Assay-Varianz von 14 Probenpaaren
Abb. 13	Zeitgewinn durch die MBT-ASTRA Methode
Tabelle 1	Verwendete Antibiotika
Tabelle 2	Gerätschaften der Laborräume

Danksagung

Im Folgenden sei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlichst gedankt:

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Sören Schubert für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas, sowie die Zurverfügungstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien. Weiterhin möchte ich mich für die professionelle Supervision und Förderung bedanken.

Ganz herzlich danke ich auch meiner Mentorin Frau Dr. med. Jette Jung für ihre exzellente fachliche Betreuung, das Einbringen neuer Ideen, sowie für die Ratschläge und konstruktive Kritik während der experimentellen Phase, als auch beim Verfassen dieser Arbeit.

Spezieller Dank gilt allen Mitgliedern der Forschungsgruppe AG-Schubert und dem gesamten Team der klinischen Mikrobiologie des Max von Pettenkofer-Instituts für ihre Unterstützung und die unterhaltsame gemeinsame Zeit.

Meinen Dank möchte ich auch Frau Dr. rer. nat. Katrin Sparbier und Herrn Dr. rer. nat. Markus Kostrzewa für ihre bereitwillige Kooperation und Hilfestellung aussprechen.

Ich danke meinen Freunden für die Ermutigung zur Durchführung dieser Dissertation, ebenso wie für die erholsamen Stunden zwischendurch.

Meiner Familie gebührt ganz besonderer Dank dafür, dass Sie mir meinen bisherigen Weg so selbstverständlich ermöglicht haben und bei größeren und kleineren Krisen stets zur Stelle sind. Mein Vater, Claus Hamacher, und mein Freund, Florian Haller, standen mir überdies beim Schreiben dieser Arbeit unermüdlich bei technischen und sonstigen Problemen mit wertvollen Ratschlägen zur Seite.

Ich danke meinen Eltern, dass sie stets nur das Beste für meine Geschwister und mich wollen und mit so viel Hingabe unser Wohl immer und ungefragt über alles stellen.

Veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit

An dieser Stelle wird auf die bereits veröffentlichten Teile der vorliegenden Arbeit verwiesen.

Publikation

Jung, J.S., **Hamacher, C.**, Gross, B., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S. (2016)

Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. *Journal of clinical microbiology*

Poster

Hamacher, C., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schmidt, L., Jung, J. and Schubert, S. (2014)

Quantitative MALDI-TOF MS for rapid susceptibility testing in septic patients.

MSACL (The Association for Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Laboratory, Inc.) 2014 EU, 1st Annual Conference and Exhibits in Salzburg, Österreich

Hamacher, C., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S. and Jung, J. (2015)

Rapid susceptibility testing directly from positive blood cultures using the novel MALDI Biotyper based MBT-ASTRA method.

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. in Münster, Deutschland

Eidesstattliche Versicherung

Hamacher, Christina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Evaluation und Optimierung eines neuen, semi-quantitativen Testes zur schnellen Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie an klinischen Proben“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 27.08.2019

Ort, Datum

Christina Hamacher

Unterschrift Doktorandin